

Genetisk och immunologisk bakgrund till atopisk dermatit hos hund

Genetic and immunological background to canine atopic dermatitis

Hanna Ygland

Handledare:

Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:06

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Atopisk dermatit, hund, genetik, S100A8, TSLP

Key words: Atopic dermatitis, canine, genetics, S100A8, TSLP

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	1
Summary.....	2
Förteckning över förkortningar.....	3
Inledning.....	4
Material och metoder	4
Litteraturoversikt	4
Atopisk dermatit hos hund.....	4
<i>Definition</i>	4
<i>Symptom</i>	5
<i>Diagnos</i>	5
<i>Behandling</i>	5
Immunologisk bakgrund.....	6
<i>Dendritiska celler</i>	6
<i>Lymfocyter</i>	6
<i>Övriga celltyper och IgE</i>	7
<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>	8
Genetisk bakgrund	8
<i>Defekt hudbarriär</i>	8
<i>Onormalt immunsvär</i>	9
S100A8.....	10
Diskussion.....	12
Referenser	14

SAMMANFATTNING

Atopisk dermatit är en sjukdom som drabbar ungefär en tiondel av världens hundar. Sjukdomen ger som följd av allergenexponering symptom såsom klåda, hudlesioner och otitis externa. Patogenesen för atopisk dermatit är komplex och multifaktoriell. Målet med denna litteraturstudie var att undersöka hur genetiska och immunologiska faktorer bidrar till sjukdomens patogenes. En obalans i T-hjälpar-(Th)-svaret vid atopisk dermatit är allmänt accepterad. Under sjukdomens akuta skede dominerar ett Th2-svar som sedan övergår i ett Th1-svar då tillståndet blir kroniskt. ”Thymic stromal lymphopoietin”, som observerats i förhöjda nivåer vid atopisk dermatit, är en cytokin som stimulerar dendritiska celler till att inducera ett Th2-svar. Förutom Th-cellerna är även andra delar av immunförsvaret såsom dendritiska celler med sin antigenpresentation, B-celler med sin produktion av IgE och ”innate lymphoid cells” med sin produktion av Th2-cytokiner viktiga i atopisk dermatit. Ett ändrat uttryck av det epidermala proteinet filaggrin har associerats med atopisk dermatit hos både hund och människa. Ändrade nivåer eller ändrad struktur av detta protein påverkar hudbarriären, något som gör individen känsligare för miljöburna allergen. En försämrad hudbarriär leder också till ökad risk för sekundära hudinfektioner vilket kan förvärra de symptom som ses vid atopisk dermatit. Många proinflammatoriska gener har setts vara överuttryckta vid atopisk dermatit. En av dessa är genen för Calgranulin A/S100 calcium binding protein A8 (S100A8) som utforskas speciellt noggrant i denna litteraturstudie. Proteinet är en ”damage-associated molecular pattern” som främst uttrycks av myeloida celler men även av hudceller. S100A8 verkar proinflammatorisk men är också viktig för keratinocytens delning och differentiering. Flera studier har observerat ändrade nivåer av antimikrobiella peptider, dock överensstämmer inte studiernas resultat. Ett ökat uttryck av ”thymus and activation-regulated chemokine” som kan verka kemotaktiskt på Th2-celler har setts i hudlesioner hos atopiska individer. Slutsatsen av denna litteraturstudie är att Th2-cytokiner är mycket viktiga för att driva den immunrespons som ses vid atopisk dermatit hos hund. Många olika cytokiner och andra proteiner har ett ändrat uttryck vid tillståndet. Fler genstudier krävs för att hitta specifika gendefekter hos hund. Även en god hudbarriär är viktig både för att förebygga atopisk dermatit och för att hindra sekundärinfektioner som förvärrar sjukdomen. S100A8 har en viktig roll i atopisk dermatit genom att verka proinflammatorisk men också genom påverkan på hudbarriären.

SUMMARY

Atopic dermatitis is a disease affecting approximately one out of ten dogs worldwide. After allergen exposure, the disease causes symptoms such as pruritus, skin lesions and otitis externa. The pathogenesis of atopic dermatitis is complex and multifactorial. The aim of this literature study was to investigate how genetic and immunological factors contribute to the pathogenesis of the disease. An imbalance in the T-helper (Th) response is generally accepted in atopic dermatitis. In the acute stages of the disease a Th2 response predominate which then transcend into a Th1 response when the condition becomes chronic. Thymic stromal lymphopoietin, which has been observed in increased levels in atopic dermatitis, is a cytokine stimulating dendritic cells to induce a Th2 response. Other parts of the immune system besides the Th cells are important in atopic dermatitis. For example, dendritic cells with their antigen presentation, B-cells with their IgE production and innate lymphoid cells with their production of Th2 cytokines. Altered expression of the epidermal protein filaggrin has been associated with atopic dermatitis in both dogs and humans. Altered levels or an abnormal structure of this protein affects the skin barrier, making the affected individuals more susceptible to environmental allergens. In atopic dermatitis overexpression of many pro-inflammatory genes have been observed. One of these genes, the Calgranulin A/S100 calcium binding protein A8 (S100A8) gene, is especially investigated in this literature study. This protein is a damage-associated molecular pattern expressed mainly by myeloid cells but also by skin cells. S100A8 acts pro-inflammatory but is also important in proliferation and differentiation of keratinocytes. Altered levels of antimicrobial peptides have been observed in several studies, with diverse results. An increased expression of thymus and activation-regulated chemokine, which may act chemotactic on Th2 cells, has been observed in skin lesions in atopic individuals. The conclusion of this literature study is that Th2 cytokines are very important in the immune response of atopic dermatitis in dogs. Many cytokines and proteins have altered expressions in this condition. Additional gene studies are necessary to find specific gene defects in dogs. An intact skin barrier is also important to prevent atopic dermatitis and to constrain secondary skin infections which exacerbate the disease. S100A8 have an important role in atopic dermatitis by acting pro-inflammatory and by affecting the skin barrier.

FÖRTECKNING ÖVER FÖRKORTNINGAR

AD	Atopisk dermatit
AMP	Antimikrobiella peptider
CAD	Atopisk dermatit hos hund
CCR4	CC chemokine receptor 4
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritisk cell
HAD	Atopisk dermatit hos människa
IDEC	Inflammatorisk dendritisk epidermal cell
IFN	Interferon
IgE	Immunoglobulin E
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
MHC	Major histocompatibility complex
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-cell	Natural killer-cell
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAR-2	Protease-activated receptor-2
PDC	Plasmacytoid dendritisk cell
PRR	Pattern recognition receptor
RAGE	Receptor of advanced glycation endproducts
S100A8	Calgranulin A/S100 calcium binding protein A8
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP1	Specificity protein 1
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
Th-	T-hjälpar-
TNF	Tumor necrosis factor
Treg-cell	Regulatorisk T-cell
TSLP	Thymic stromal lymphopietin

INLEDNING

Atopisk dermatit (AD) är en multifaktoriell och komplex hudsjukdom som, förutom att vara genetisk predisponerad, även uppkommer till följd av störd immunfunktion, överkänslighet mot allergen, defekt hudbarriär och miljöfaktorer. Sjukdomen är kronisk och orsakar lidande för hunden i form av bland annat kraftig klåda. En raspre disposition som tyder på en genetisk koppling hos hund har uppmärksammats. Hur mycket genetik respektive miljö spelar in varierar mellan raser. Atopisk dermatit hos hund (CAD) uttrycker sig ofta olika hos olika raser (Nutall *et al.*, 2013). Det är inte en specifik gendefekt som orsakar CAD. Sjukdomen är polygen och har en komplex nedärvning. Likheter mellan felreglerade gener har hittats hos hund och människa (Wood *et al.*, 2009). Genom att hitta gendefekter kan mer förståelse fås om sjukdomen.

Atopisk dermatit hos människa (HAD) och hund liknar varandra, hos båda arterna är AD en inflammatorisk dermatos med karaktäristiska symptom. Tillståndet är vanligt och drabbar upp till en tredjedel av barnen i västvärlden och ungefär en tiondel av alla hundar (Nutall, 2013). Atopisk dermatit hos hund och människa delar många egenskaper, till exempel predilektionsplats, genetisk bakgrund, ålder vid första symptom, epidermala förändringar och immunopatologiska mekanismer. Både HAD och CAD karaktäriseras av en obalans i lymfocytpopulationen och deras cytokiner (Klukowska-Rötzler *et al.*, 2013).

Denna litteraturstudie ger en inblick i både den genetiska och immunologiska bakgrunden till atopisk dermatit hos hund. Betoning ligger på genetik bakom sjukdomen. Speciellt fokus har tilldelats den proinflammatoriska molekylen Calgranulin A/S100 calcium binding protein A8 (S100A8) och hur genen med samma namn uttrycks i CAD.

MATERIAL OCH METODER

Litteratursökning har skett i databaserna Primo, Scopus och PubMed. De sökord som använts är "atopic dermatitis", canine OR dog OR dogs, genetic OR inher*, S100A8, "skin barrier", "gene expression", immun*, treatment och TSLP i olika kombinationer. Många referenser från framsökta artiklar har också använts som litteratur. För att säkerställa god relevans lästes "abstract" för varje artikel innan artikeln valdes ut. Fokus i sökningarna har varit allmänt om atopisk dermatit, immunförsvaret bakom sjukdomen, genetik bakom sjukdomen samt S100A8. För att få nyare, och förmodligen mer relevanta, artiklar begränsades årtal i sökning. Artiklar publicerade före år 2000 har inte använts.

LITTERATURÖVERSIKT

Atopisk dermatit hos hund

Definition

En definition av atopisk dermatit är "en genetisk predisponerad inflammatorisk och kliande allergisk hudsjukdom med karaktäristiska kliniska egenskaper associerade med immunoglobulin E (IgE), vanligtvis riktad mot allergen i miljön" ("a genetically predisposed inflammatory and pruritic allergic skin disease with characteristic clinical features associated with IgE, most commonly directed against environmental allergens") (Halliwell, 2006).

Symptom

I en studie av Favrot *et al.*, (2010) visade det sig att symptomen hos hund vanligtvis börjar med klåda, ofta följt av sekundära infektioner och otitis externa. I studien drabbades tassar, axilla, buk och ytteröra värst. Andra allergiska symptom såsom nässelutslag, rinit, pyotraumatisk dermatit och interdigitala fistlar var ovanligt. Bland de sjuka hundarna som användes i studien sågs vissa raser såsom West Highland white terrier, Labrador retriever, Schäfer och Golden retriever vara överrepresenterade. Då ingen kontrollpopulation användes kunde en raspre disposition dock inte fastställas.

Diagnos

Diagnos ställs utifrån symptom och den karaktäristiska histologiska bild som är associerad med sjukdomen. Det finns dock andra kliande dermatoser som ger en liknande klinisk och histologisk bild och dessa måste uteslutas innan diagnos kan fastställas. Lesionsfri atopisk hud karaktäriseras histologiskt av milda intracellulära ödem i epidermis och perivaskulära infiltrat av lymfocyter, monocyter, dendritiska celler (DCs) och mastceller (Nutall *et al.*, 2013). Epidermis i akuta lesioner har kraftigare intracellulära ödem och Langerhans celler har IgE bundet till ytan. I dermis syns ett tydligt T-cellsinfiltrat samt infiltrat av monocyter/makrofager, eosinofiler och mastceller, dock inga basofiler eller neutrofiler. Kroniska lesioner karaktäriseras av hyperplasi, hyperkeratos och minimal intracellulär ödembildning i epidermis. Dessa förändringar ger tillsammans en förtjockad hud. I epidermis ses också dendritiska celler med IgE och mastceller som ofta är degranulerade. Att mastcellerna är degranulerade innebär att cellerna är aktiverade. Mängden eosinofiler tros öka i dermis då produkter från cellerna detekterats i lesionerna (Bieber, 2010). Under årens gång har olika kriterier för sjukdomen arbetats fram, de senaste av Favrot *et al.*, (2010).

Dessa kriterier är:

- Symptom ses innan hunden fyllt tre år
- Hunden lever till största del inomhus
- Klådan lindras vid behandling med glukokortikoider
- Klådan uppkommer innan hudlesionerna
- Framtassar och insidan av ytterörat drabbas
- Öronkanterna drabbas ej
- Dorsolumbala regionen drabbas ej

Kriterierna är inte patognomona och då de används för att diagnosticera sjukdomen finns risk för feldiagnos. Idag finns inga tester för att bekräfta en AD-diagnos hos hund, alla differentialdiagnoser måste istället uteslutas. För att hitta en bra behandling kan serumbaserad diagnostik och gentester användas (Marsella *et al.*, 2012).

Behandling

Behandling av AD bör i första hand vara förebyggande genom att identifiera allergen och undvika dessa. Mot akut inflammation kan glukokortikoider ges oralt eller topiskt. Dessa ger en generell inflammationshämmning vilket mildrar symptom, åtminstone på kort sikt. Effekten minskar med tiden samtidigt som allvarliga bieffekter kan utvecklas. Då kutan exponering för allergen visats

sig viktig vid AD kan bad minska mängden allergen som lyckas penetrera huden. Sekundärinfektioner måste diagnosticeras och behandlas. På grund av resistensproblem bör systemisk antibiotika inte användas som kronisk behandling mot sekundära bakterieinfektioner. Topikal administrering av antimikrobiella medel bör användas som långsiktig behandling i mildare fall, mer allvarliga fall kräver dock en kortvarig systemisk behandling. Allergen-specifik immunoterapi bör användas när det är möjligt, speciellt hos unga individer. Hudbarriärens betydelse i CAD kommer fram allt mer och behandling för att bevara en god barriär ses som allt viktigare. Behandling med essentiella fettsyror, kolesterol och ceramider har visat positiva resultat men fler studier krävs för att bekräfta detta (Marsella, 2012).

Immunologisk bakgrund

Både det medfödda och det förvärvade immunförsvaret medverkar i AD. En intakt barriär i både hud och tarm är det första skyddet mot exogena ämnen och kan anses tillhöra det medfödda immunförsvaret (Wollenberg *et al.*, 2011). Keratinocyter har förmågan att producera cytokiner och antimikrobiella peptider (AMPs) mot exogena mikroorganismer. Hundars keratinocyter har också visat sig producera proinflammatoriska substanser som svar på allergen och antigen (Marsella *et al.*, 2012). I det medfödda immunförsvaret känns pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) igen av pattern recognition receptors (PRRs). Då PAMPs binder PRRs aktiveras signalkaskader och effektormolekyler såsom cytokiner och AMPs frisätts (Wollenberg *et al.*, 2011).

Dendritiska celler

Dendritiska celler är antigenpresenterande celler som initierar det förvärvade immunsvaret. Hudens DCs delas in i Langerhans celler, inflammatoriska dendritiska epidermala celler (IDECs) och plasmacytoida dendritiska celler (PDCs). Vid flera olika hudåkommor har PDCs observerats i huden, dock är antalet mycket lågt i AD-lesioner. Dessa celler producerar stora mängder interferon (IFN) typ 1 vid virala infektioner och deltar på detta sätt i det medfödda immunförsvaret. Utan denna IFN-produktion ökar risken för virala infektioner. Cellerna inducerar också en Th2-respons och aktiverar regulatoriska T-celler (Treg) i det förvärvade försvaret (Wollenberg *et al.*, 2011). Plasmacytoida dendritiska celler uttrycker IgE-receptorer på ytan och uttrycket av dessa ökar vid AD. Då IgE binder in aktiveras receptoreterna vilket ändrar uttrycket av major histocompatibility complex (MHC)-molekyler. Detta medför apoptos av cellerna vilket förklarar de låga nivåerna av PDCs i AD-lesioner (Bieber, 2010). Langerhans celler kan binda allergenspecifika IgE och driva en Th2-cytokinrespons (Marsella *et al.*, 2012) medan stimulans av IgE-receptor på IDECs istället ger en Th1-respons (Bieber, 2010).

Lymfocyter

Vid AD sker Th-responsen i två faser. I akuta fasen produceras Th2-cytokiner och i den kroniska fasen produceras Th1-cytokiner (Marsella *et al.*, 2012). En Th-obalans mot Th2 med IgE och eosinofili i sjukdomens akuta skede är generellt accepterad. I det akuta skedet ses Th2-cytokiner i både lesioner och övrig hud (Bieber, 2010). Th2-cytokinerna interleukin (IL)-4, IL-5, IL-6 och IL-13 ger en humoral immunitet med IgE-produktion. I kroniska lesioner finns främst Th1-cytokiner såsom IFN- γ , IL-2, IL-12 och Tumor necrosis factor (TNF)- α vilket ger en cellmedierad immunitet

(Nutall *et al.*, 2002). Th17-celler är en annan typ av Th-cell som ses vid AD. Dessa medverkar normalt i skyddet mot patogener men kan också framkalla vävnadsinflammation. Th17-cellerna producerar cytokiner som IL-17, IL-22 och IL-25. I akuta lesioner uttrycks IL-17. I kroniska lesioner finns istället IL-22 som nedreglerar gener involverade i slutgiltig differentiering av huden, vilket kan leda till epidermal hyperplasi. IL-25 är viktig för ett Th2-svar och inducerar produktion av Th2-cytokiner (Marsella *et al.*, 2012).

Regulatoriska T-celler reglerar T-cellsvar och verkar immunosuppressivt. Cellerna har visat sig motverka både Th1- och Th2-respons och finns av olika typer. Typ 1 producerar IL-10 och ”Transforming growth factor- β ”. Typ 1-celler har hittats i huden hos människor med AD. En annan typ av Treg-cell, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Treg-celler kunde dock inte hittas vilket tyder på en obalans i Treg-populationen (Verthagen *et al.*, 2006).

Övriga celltyper och IgE

Th2-cytokinerna IL-4 och IL-13 medverkar initialt i vävnadsinflammation och kan mediera ökat uttryck av adhesionsmolekyler på epitel (Bieber, 2010). Överproduktion av IL-4 bidrar till att B-celler växlar till en IgE-produktion (Marsella *et al.*, 2012). Mastceller degranulerar till följd av exponering för allergen, då IgE binder mastcellerna fås en ökad allergenkänslighet. Inbindning av IgE till Langerhans celler ökar allergenpresentationen. Detta gör atopiska hundar känsliga för små mängder allergen (Nutall *et al.*, 2013). Histamin produceras i höga koncentrationer av mastceller och basofiler. Då histamin frisätts fås vasodilatation och en inflammatorisk respons. Denna vasodilatation medför att det blir lättare för leukocyter och andra proinflammatoriska aktörer att ta sig ut till vävnad. Histamin-1-receptorer finns på glatt muskulatur, endotel och vävnad i centrala nervsystemet (Marsella *et al.*, 2012).

Eosinofilers överlevnad ökar av IL-5. Eosinofilerna bidrar till den allergiska inflammationen genom sekretion av cytokiner och mediatorer som inducerar vävnadsskada då reaktiva syreradikaler och toxiska proteiner produceras. Systemisk eosinofili är kopplad till hur svårt sjukdomen uttrycker sig. (Bieber, 2010).

Makrofager är en viktig celltyp i kroniska lesioner. Dessa celler är viktiga under hela inflammationsförloppet och kan producera cytokiner som både påbörjar och avslutar inflammation (Marsella *et al.*, 2012). Makrofagernas aktivitet beror på cytokinmiljön runt cellerna (Hsu *et al.*, 2014).

Natur killer-celler (NK-celler) lyserar celler som saknar MHC klass 1-molekyler på ytan. NK-cellerna släpper då ut granula innehållande perforiner och granzymmer. Cellerna producerar också IFN- γ , TNF- α , IL-5 och IL-8. Antalet NK-celler i blodet sjunker vid AD, celltypen har dock identifierats i lesioner tillsammans med DCs (Wollenberg *et al.*, 2011).

Innate lymphoid cells (ILCs) typ 2 finns i huden och har en lymfoid morfologi men saknar antigenreceptorer och markörer för DCs. ILCs producerar Th2-cytokiner och har associerats med AD hos människa. Cellerna aktiveras av Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) men kan också

aktiveras av IL-33 och IL-25 (Ong, 2014) som vid skador i hudbarriären produceras av epitelceller (Roediger *et al.*, 2014).

Thymic stromal lymphopoietin

TSLP är en IL-7-liknande cytokin som främst uttrycks av epitelceller, inklusive keratinocyter (Bieber, 2010). I en studie av Klukowska-Rötzler *et al.* (2013) visades cytokinen stimulera humana DCs att mogna och effektivt presentera antigen. Då patogener stimulerar DCs produceras IL-12 som är viktig för ett Th1-svar. Om TSLP stimulerar DCs induceras istället ett Th2-svar. I studien sågs en ökning av TSLP i både hudlesioner och lesionsfri hud hos atopiska hundar jämfört med friska kontroller. Skillnad av uttryck mellan lesioner och lesionsfri hud var inte signifikant. Uttrycket av TSLP ökade som svar på olika stimuli, ett av dessa var allergen från *Dermatophagoides farinae* (dammkvalster). Det blev dock inget ökat uttryck då detta allergen värmebehandlades innan exponering.

Genetisk bakgrund

Många gener som kan kopplas till CAD har hittats genom studier av hundens genom. Forskning rörande genetisk bakgrund till CAD har gett mycket förståelse för sjukdomen men det finns mycket kvar att utforska. De studier som gjorts har inte helt korrelerat (Nutall, 2013). I en microarray-analys av Merryman-Simpson *et al.* (2008) visade sig 54 av nära 22 000 gener ha ett signifikant annorlunda uttryck i huden hos atopiska hundar jämfört med friska kontrollhundar. Många av dessa gener var associerade med immunförsvaret, ett exempel är serum amyloid A som rekryterar immunceller till inflammationsplatser. De flesta av de immunförvarsrelaterade generna uttrycktes i förhöjda nivåer i lesioner, med vissa undantag. Övriga gener med annorlunda uttryck fanns främst i lesionsfri hud där de ofta var underuttryckta. Många av dessa gener är involverade i jontransport, andra i exempelvis cellcykel och apoptos. I en tidigare microarray-analys av Sugiura *et al.* (2005) hittades tio gener kopplade till HAD. Fyra av dessa låg i locus 1q21. De fyra generna kodade för S100A7 och S100A8 som var överuttryckta och loricrin och filaggrin som var underuttryckta. Loricrin och filaggrin är tillsammans med ”small proline-rich proteins” och keratiner viktiga i hudbarriären. Även vissa keratiner visade sig vara överuttryckta i aktiva lesioner vilket bidrar till den epidermala hyperplasin som ses vid AD.

Defekt hudbarriär

En störd hudbarriär har visats viktig för ADs patogenes. Barriären kan bland annat störas av regelbundna bad, men beror också av genuttryck (Nutall *et al.*, 2013). En intakt hudbarriär krävs för att undvika vätskeförluster genom huden och för att hindra exogena substanser från att penetrera huden. Stratum corneum med dess korneocyter (förhornade keratinocyter) har en viktig roll i detta. Det är visat att patienter med AD har ökad transepidermal vätskeförlust, även om förlusten varierar hos atopiska hundar (Olivry, 2011). Ceramider är viktiga lipider i cellmembranen och en minskad ceramidförekomst har associerats med ökad transepidermal vätskeförlust (Shimada *et al.*, 2009). I en studie av Reiter *et al.* (2009) sågs en signifikant lägre mängd Ceramid 1 och Ceramid 9 i lesionsfri hud hos atopiska hundar jämfört med friska kontroller.

I en studie av Marsella *et al.* (2010) undersöktes strukturen i övre epidermis hos hundar med och utan AD. Stratum corneum visade sig vara mindre kompakt med större intercellulära mellanrum hos atopiska hundar. Efter allergenexponering ökade avståndet mellan cellerna endast minimalt hos friska hundar, medan det ökade kraftigt hos hundar med AD. Hos atopiska hundar var hålrummet mellan cellerna fyllda med onormalt strukturerade lipider och lamellkroppar kunde ses i dåligt organiserade korneocyterna. Korneocyterna var hos friska hundar väl organiserade, utan innehåll av lamellkroppar. Författarna kunde konstatera att det finns stora skillnader i huden mellan friska och atopiska individer.

Filaggrin

Mutationer i filaggringenen är starkt kopplat till HAD och har även associerats med CAD (Nutall *et al.*, 2013). Filaggrin är ett protein som produceras av hudcellerna och bryts ner till aminosyror då cellerna mognar. Proteinet är viktigt för epidermal differentiering och krävs för att bibehålla fukt i de yttersta hudlagren. Om Filaggrin inte uttrycks normalt fås en torr och flagnande hud som lättare penetreras av allergen och andra exogena ämnen. Ökad permeabilitet för främmande substanser medför att kroppen lättare reagerar på antigen (Marsella *et al.*, 2012, Chervet *et al.*, 2010).

Genom att använda sig av immunofluorescensmärkta filaggrin-antikroppar kunde Chervet *et al.* (2010) konstatera ett onormalt uttryck av filaggringenen hos atopiska hundar. Några av hundarna med AD hade ett uttryck som liknade kontrollhundarnas normala mönster men främst sågs ett reducerat uttryck hos de atopiska individerna. Chervet *et al.* observerade även ett onormalt protein hos några av de atopiska hundarna. Santoro *et al.* (2013) undersöktes uttrycket av mRNA för filaggringenen hos atopiska respektive friska beaglar. Ett ökat uttryck av mRNA upptäcktes hos atopiska hundar jämfört med friska kontroller. I samma studie undersöktes också distributionen av själva proteinet. Mängden protein visade sig inte vara ändrad hos atopiska hundar, dock var distributionen mycket oregelbunden jämfört med kontrollerna.

Sekundära hudinfektioner

Sekundära infektioner frammanar inflammation i huden och försvårar symptomen vid CAD. Atopisk hud blir lätt koloniserad av exempelvis *Staphylococcus* spp. vilket beror på flera olika faktorer såsom minskad mängd AMPs och ökad mängd adhesionsmolekyler. Koloniseringen kan medföra ökad mängd IL-4 och IL-13 och ge ytterligare skada i huden då bakterierna producerar proteaser och ceramidaser (Marsella *et al.*, 2012). Specifika IgE-antikroppar mot stafylokoksuperantigen har setts korrelera med hur svår sjukdomen är (Bieber, 2010). Kolonisering av exempelvis *S. aureus*, *Malassezia* spp. och *Candida albicans* kan få värden att producera specifika IgE-antikroppar som aktiverar basofiler, vilket leder till frisättning av histamin. Antigen från *S. aureus* kan binda toll-like receptors vilket inducerar produktion av TSLP hos keratinocyter (Ong, 2014).

Onormalt immunsvär

Antimikrobiella peptider

Flera studier har visat att uttrycket av AMPs i HAD-lesioner är lägre än i humana psoriasis-lesioner. Detta kan bidra till att atopiska individer är extra känsliga för hudinfektioner (Ong *et*

al., 2002, Mallbris *et al.*, 2010). Ballardini *et al.* (2009) såg dock en ökning av AMPs i lesioner vid HAD. Teorin om lägre uttryck anses generellt ha mest stöd (Wollenberg *et al.*, 2011). I en studie på hund visade sig uttrycket av vissa AMPs minska och andra öka. Ett reducerat uttryck ansågs vara det främsta fyndet (Van Damme *et al.*, 2009).

Thymus and activation-regulated chemokine

”Proteas-activated receptor-2” (PAR-2) aktiveras av proteaser som bland annat kan komma från allergen med proteolytisk aktivitet (exempelvis dammkvalster, mögel och pollen). Aktiveringen av PAR-2 har visat sig inducera uttryck av ”Thymus and activation-regulated chemokine” (TARC) i hundars keratinocyter. Kemokinen är en ligand för ”CC chemokine receptor 4” (CCR4) som främst uttrycks av Th2-celler. En ökning av TARC har associerats med AD (Maeda *et al.*, 2013). Även uttryck av CCR4-mRNA har visat sig högre i lesioner jämfört med hud utan lesioner (Maeda *et al.*, 2002a). I en annan studie av Maeda *et al.* (2002b) detekterades TARC-mRNA i alla lesioner, men ingen förekomst hittades i lesionsfri eller frisk hud. IFN- γ , IL-1 β och TNF- α hade alla ett signifikant högre uttryck i lesioner jämfört med lesionsfri och frisk hud. Nivåerna visade sig korrelera med uttrycket av TARC och den allmänna uppfattningen är att dessa cytokiner inducerar uttryck av TARC.

Thymic stromal lymphopoietin

Periostin, ett extracellulärt protein som induceras av Th2-cytokiner, har visat sig öka uttrycket av TSLP hos keratinocyter. Proteinet har också visat sig öka keratinocyters proliferation vilket möjliggör mer produktion av TSLP (Shiraishi *et al.*, 2012). En studie på möss har visat att mekanisk skada på huden stimulerar DCs att producera IL-10, vilket leder till en Th2-respons. Den mekaniska skadan inducerar cytokiner som uppreglerar uttryck av TSLP. Denna uppreglering anses viktigt för att inducera IL-10-produktion hos DCs. Modifierade möss som inte uttrycker TSLP fick inte någon uppreglering av IL-10 från DCs och inte heller en uppreglering av Th2-cytokinerna IL-4 och IL-13 (Oyoshi *et al.*, 2010). I en studie hos människa har ett minskat uttryck i genen för en transkriptionsfaktor, ”Specificity protein 1” (Sp1), associerats med AD. Då uttrycket minskar ökar uttrycket av flera andra gener, bland andra TSLP-genen (Bin *et al.*, 2011). I en studie från 2010 hittades en ”single nucleotide polymorphism” (SNP) i genen för TSLP-receptorn hos alla åtta hundraser som deltog i studien. Övriga SNPs som hittades visade sig bara vara signifikanta hos enstaka raser. Då TSLP-genen inte hade karaktäriserats hos hund då studien utfördes ingick denna gen inte i studien (Wood *et al.*, 2010). Idag är TSLP-genen karaktäriserad hos hund. Detta gjordes av Klukowska-Rötzler *et al.* (2013) genom att isolera RNA från keratinocyter för att sedan använda sig av omvänd transkription och därmed få cDNA som kunde sekvenseras. Nukleotidsekvensen visade 70 procent likhet med den humana TSLP-genen.

S100A8

I den tidigare nämnda microarray-analysen utförd av Merryman-Simpson *et al.* (2008) visade sig endast uttrycket av en gen, genen för S100A8, skilja sig signifikant mellan hudlesioner och lesionsfri hud. Skillnaden mellan lesioner och frisk hud var mycket stor men skillnaden mellan lesionsfrihud och frisk hud var inte signifikant. I en studie hos hund jämfördes frisk hud, hud från

lesioner och lesionsfri hud. Uttrycket av genfamiljen S100 visade signifikant skillnad i alla olika jämförelser (Wood *et al.*, 2009).

S100A8 uttrycks av myeloida celler som neutrofiler och makrofager. Proteinet uttrycks även av hudceller men inte av till exempel lymfocyter eller eosinofiler (Kerkhoff *et al.*, 2012). I en studie av Hsu *et al.* (2014) kunde ett ökat uttryck av S100A8 från makrofager ses vid aktivering av toll-like receptor-9. I försöket användes syntetiska CpG-motiv för att efterlikna CpG-motiv i mikrobers DNA. Makrofager producerar även IL-10 och prostaglandin E₂ som svar på CpG-motiv. Dessa inhiberar IL-12 respektive IFN- γ vilket hämmar en Th1-respons. IL-10 och prostaglandin E₂ bidrar även till uttrycket av S100A8 och gör att induceringen av uttrycket går fortare. De kan dock inte själva inducera ett uttryck av S100A8.

Intracellulärt överuttryck av S100A8 och bindningspartnern S100A9 aktiverar "Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" (NF- κ B) som är viktig för keratinocytens reglering. Cellerna blir mer väldifferentierade samtidigt som tillväxten minskar. Det finns flera fynd, bland annat att de uttrycks av keratinocyter i sår, som indikerar att S100A8 och S100A9 har en stimulerande roll i epitelmigrationen. Extracellulärt har S100A8/A9 istället en mitogen aktivitet på keratinocyter, i motsats till den tillväxthämmande intracellulära effekten. Mängden som frisätts från icke-myeloida celler är betydligt lägre än den som frisätts från myeloida celler (Kerkhoff *et al.*, 2012).

S100A8 är en damage-associated molecular pattern (DAMP) som normalt finns intracellulärt men som vid skada på cellen kan sekreteras och förekomma extracellulärt. Genom att aktivera toll-like receptor-4 eller Receptor of advanced glycation endproduct (RAGE), som bland annat finns på keratinocyter, är S100A8 med och frammanar en inflammatorisk respons. I en studie där uttrycket av S100A8 undersöktes i en Th2- och Th17-cytokinrik miljö såg man att Th17-cytokinerna IL-17A, IL-17F och IL-22 inducerade uttryck av S100A8. Th2-cytokinerna IL-4 och IL-13 visade ingen koppling till mängden S100A8. Keratinocyter stimulerades också med *Dermatophagoides farinae* vilket visade på en ökad sekretion av S100A8 tolv timmar efter exponeringen. Om exponering för både Th17-cytokiner och *Dermatophagoides farinae* användes ökade både intracellulära och extracellulära nivåer av S100A8 (Shan *et al.*, 2014). Frisättning av S100A8 stimuleras av TNF- α och en positiv feedback mellan RAGE och NF- κ B tros bibehålla frisättning av TNF- α och därmed S100A8 (Merryman-Simpson *et al.*, 2008).

Chung *et al.* (2010) utförde en studie hos hund där monoklonala antikroppar användes för att detektera S100A8 hos atopiska hundar. Resultatet visade på signifikant förhöjda serumnivåer hos atopiska individer. In vitro kunde Chung *et al.* se att S100A8 verkade ha kemotaktisk verkan på neutrofiler. En regressionsanalys visade på stark korrelation mellan mängden S100A8 i serum och hur svårt sjuk hunden var. Även Wood *et al.* (2009) såg ett samband mellan uttryck av S100A8 och klinisk allvarlighetsgrad. Uttrycket av S100A8 i denna studie korrelerade speciellt starkt med positiva reaktioner vid intradermalt allergitest.

DISKUSSION

Denna litteraturstudie har bekräftat komplexiteten för uppkomsten av atopisk dermatit. Det är uppenbart att det är många faktorer som spelar in. Allt börjar med en defekt hud- eller tarmbarriär som tillåter allergen att ta sig in i kroppen och därmed inducera en immunrespons. Det ändrade uttrycket av filaggrin som observerats bidrar förmodligen stort till den defekta barriären. Att det rör sig om ett ändrat protein och inte bara en ändrad mängd tyder på en gendefekt. Enligt Chervet *et al.* (2010) kan det röra sig om en "loss-of-function"-mutation vilket ger ett icke funktionellt protein. Att Santoro *et al.* (2013) såg ett ökat uttryck av mRNA men en normal mängd protein med icke normal distribution tyder enligt författarna på en ökad nedbrytning eller post-transkriptionell ändring snarare än minskat uttryck av filaggringen. En påverkan på hudbarriären kan medföra att keratinocytens förmåga att producera AMPs och proinflammatoriska substanser inte regleras normalt vilket kan bidra till AD. Genom att upprätthålla en god barriär kan en immunrespons, och därmed kliniska symptom, motverkas.

Det är många faktorer som påverkar hur den förvärvade immunresponsen ska se ut. I Atopisk dermatit verkar Th2-cytokiner vara avgörande och flera olika cykler, eller positiva "feed-back" kan skådas. En av dessa cykler inkluderar Periostin vars uttryck induceras av Th2-cytokiner. Då Periostin ökar uttrycket av TSLP fås ett ökat Th2-svar och därmed ännu mer Th2-cytokiner. En annan cykel är den då Th2-cytokiner bidrar till IgE-produktion. IgE ger ökad antigenpresentation och därmed ett ökat Th2-svar. Med detta som bakgrund kan produktionen av Th2-cytokiner anses mycket viktig för den inflammatoriska process som ses vid atopisk dermatit och därmed vara avgörande för hela sjukdomsförloppet.

Dermatophagoides farinae är ett vanligt allergen vid CAD och fyndet att allergen från kvalstret ger ökat uttryck av TSLP talar för att TSLP har en betydande roll i CAD. Att uttryck av TSLP inte induceras vid värmebehandlat allergen från dammkvalster beror enligt Klukowska-Rötzler *et al.* (2013) på att det förmodligen är proteaser eller andra värmelabila komponenter i allergenet som inducerar uttryck av TSLP. Att TSLP stimulerar DCs att inducera ett Th2-svar tyder på att TSLP har en viktig roll i Th-obalansen. Det ökade uttrycket kan induceras av cytokiner men förmodligen finns även en genetisk bakgrund. Hos människa har det visats att uttrycket av Sp1 påverkar uttrycket av TSLP men Bin *et al.* (2013) diskuterade inte vad som ger det minskade uttrycket av Sp1. Det kan mycket väl vara en gendefekt som ligger bakom detta. Att Wood *et al.*, 2010 hittade en SNP i genen för TSLP-receptorn tyder på att det mycket väl kan finnas en defekt även i genen för TSLP. Då genen för TSLP idag är karakteriserad skulle en liknande studie där denna gen ingick vara mycket intressant.

Att S100A8 uttrycks signifikant högre i lesioner jämfört med lesionsfri hud tyder på att S100A8 främst har en viktig roll i lesionerna. Att Wood *et al* såg signifikanta skillnader i alla jämförelser av S100A8 talar dock för att S100A8 kan vara involverad i utvecklingen av både den Th2-dominerade akuta fasen och den Th1-dominerade kroniska fasen av CAD. Oavsett vilket är det tydligt att S100A8 medverkar i AD. S100A8's påverkan på hudbarriären i AD sker förmodligen genom den extracellulära, mitogena effekten då sjukdomen karakteriseras av epidermal hyperplasi. Detta påstående styrks av att en ökad sekretion av proteinet setts i samband med

allergenexponering. Den kemotaktiska verkan på neutrofiler är den enda proinflammatoriska egenskap hos S100A8 som nämns i denna studie. Detta är intressant då neutrofiler inte associerats med atopisk dermatit och inte heller ses histologiskt. S100A8 uttrycks också av neutrofiler. Kopplingen mellan neutrofiler och S100A8 tyder på att neutrofiler kan ha en mer betydande roll i sjukdomsförloppet än vad som anses idag.

Det har varit svårt att hitta relevant litteratur om S100A8 då proteinet tycks medverka i en mängd olika processer i kroppen. Förutom kemotaktisk verkan på neutrofiler har mekanismen för hur S100A8 verkar proinflammatorisk inte kunnat fastställas med den litteratur som använts. Detsamma gäller för den genetiska bakgrunden till proteinets ändrade uttryck. Att Hsu *et al.* (2014) såg ett ökat uttryck av S100A8 som svar på PAMPs tyder på att sekundärinfektioner påverkar uttrycket. Då Th2-cytokiner inte tycks påverka uttrycket verkar proteinet dock inte ingå i de Th2-cykler som tidigare nämnts.

Hundar lever i samma miljö som människor och utsätts för samma allergen och irriteranter. Hundar och människor har även ett liknande immunförsvar. Detta innebär att studier hos hund kan användas som modell för människa och vice versa. Viktigt att tänka på är att hundar och människor inte har exakt samma gener och sådana faktorer som påverkas genetiskt kan inte alltid extrapoleras till den andra arten.

Denna litteraturstudie är relativt bred och har bara skrapat på ytan av faktorer som påverkar CAD. Det hade kanske varit mer givande om studien specificerats noggrannare och gått in djupare på någon eller några få faktorer. Även om många olika faktorer uppmärksammats i denna studie finns förmodligen en mängd andra som inte tagits upp. Det finns väldigt mycket litteratur inom området och endast en bråkdel har presenterats här. Forskningen om atopisk dermatit har kommit långt men det finns fortfarande områden som inte utforskats, speciellt vad gäller genetiken. Olika resultat har observerats i olika studier, exempelvis uttrycket av AMPs, något som delvis kan bero på miljöns påverkan och urvalet av studiepopulationen. Då den genetiska bakgrunden varierar mellan raser, något som förklarar varför sjukdomen uttrycker sig olika hos olika raser, påverkar även rassammansättningarna i studiepopulationerna resultatet. Det skulle vara intressant med större studier där delpopulationer av olika raser användes. Jämförelser skulle då kunna göras både inom och mellan raser. Studierna bör utföras med hundar som lever i liknande eller standardiserad miljö. Studien av Wood *et al.* (2010) använde sig av åtta olika raser och kunde då dra betydligt fler, förmodligen mer korrekta, slutsatser jämfört med andra studier som använt sig av olika raser. Att slumpmässigt välja ut hundar av olika raser har fördelen att resultatet gäller en större population av hundar medan fördelen av att använda en enstaka ras är att resultatet blir mer korrekt och relevant för just den rasen. Ett exempel på en studie som bara använde sig av en ras är den av Santoro *et al.* (2013) då endast beaglar användes. Eftersom endast en ras användes påverkar färre faktorer resultatet och det kan därmed vara lättare att hitta signifikans.

Ett av syftena med denna litteraturstudie var att hitta en genetisk bakgrund till atopisk dermatit. Den litteratur som använts har visserligen beskrivit ändrade genuttryck men inte utforskat speciellt mycket om rent genetiska defekter. Det är möjligt att studier som behandlar detta fallit bort i urvalet av artiklar eller så saknas denna typ av studie hos hund. Det sistnämnda kan mycket väl

vara fallet då hunden använts mycket som modell till människa och studier om specifika gendefekter kan vara svåra att använda på detta sätt. Hos hund är aveln mycket kontrollerad och genom att identifiera gendefekter kan atopisk dermatit förmodligen till viss del avlas bort. Genom att minska antalet hundar med atopisk dermatit kan livskvalitén öka för de hundar som slipper drabbas och ägarna slipper kliande hundar och dyra veterinärbesök. Metoder för att lättare diagnosticera CAD skulle också vara en fördel då fler hundar skulle kunna få behandling som lindrar sjukdomens obehag. Enligt Maeda *et al.* (2002b) skulle CCR4 kunna vara en bra markör för diagnos då ett överuttryck associerats med AD. Det gäller att hitta en markör som är lätt att detektera, utan för höga kostnader eller onödigt lidande för djuren. Svårigheten att hitta en sådan markör grundar sig i den multifaktoriella bakgrunden. Det är inte säkert att det går att hitta en specifik markör som finns hos merparten, helst alla, atopiska individer.

Sammanfattningsvis är hudbarriären viktig för att förebygga atopisk dermatit då färre allergen kan penetrera huden vid en god barriär. Sekundärinfektioner verkar ha en viktig roll för hur kraftiga hundens symptom är och kan motverkas genom en bättre hudbarriär. Fler studier på gener krävs så att specifika gendefekter kan identifieras och avlas bort. Det behövs även fler studier för att reda ut alla motstridande resultat som finns idag.

REFERENSER

- Ballardini, N., Johansson, C., Lilja, G., Lindh, M., Linde, Y., Scheynius, A. & Agerberth, B. (2009). Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *British Journal of Dermatology*, 161: 40-47.
- Bieber, T. (2010). Atopic Dermatitis. *Annals of Dermatology*, 22: 125-137.
- Bin, L., Kim, B.E., Hall, C.F., Leach, Sonia M. & Leung, D.Y.M. (2011). Inhibition of Transcription Factor Specificity Protein 1 Alters the Gene Expression Profile of Keratinocytes Leading to Upregulation of Kallikrein-Related Peptidases and Thymic Stromal Lymphopoietin. *Journal of Investigative Dermatology*, 31: 2213-2222.
- Chervet, L., Galichet, A., Mclean, I.W.H., Chen, H., Suter, M.M., Roosje, P.J. & Müller, E.J. (2010). Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 19: 343-346.
- Chung, T., Oh, J., Lee, Y., Kang, K., Jung, J., Youn, H. & Hwang, C. (2010). Elevated Serum Levels of S100 Calcium Binding Protein A8 (S100A8) Reflect Disease Severity in Canine Atopic Dermatitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72: 693-700.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21: 23-32.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114: 207-208.
- Hsu, K., Ming Chung, Y., Endoh, Y. & Geczy, C. L. (2014). TLR9 Ligands Induce S100A8 in Macrophages via a STAT3-Dependent Pathway which Requires IL-10 and PGE2. *PLOS one*, 9: e103629 1-12.
- Kerkhoff, C., Voss, A., Scholzen, T.E., Averill, M.M., Zanker, K.S. & Bornfeldt, K.E. (2012). Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. *Experimental Dermatology*, 21: 822-825.

- Klukowska-Rötzler, J., Chervet, L., Müller, E.J., Roosje, P., Marti, E. & Janda, J. (2013). Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24: 54-59.
- Maeda, S., Fujiwara, S., Omori, K., Kawano, K., Kurata, K., Masuda, K., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2002b). Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88: 79-87.
- Maeda, S., Maeda, S., Ohno, K., Kaji, N., Hori, M., Fujino, Y. & Tsujimoto, H. (2013). Protease-activated receptor-2 induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in canine keratinocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153: 17-25.
- Maeda, S., Okayama, T., Omori, K., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. & Tsujimoto, H. (2002a). Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90: 145-154.
- Mallbris, L., Carlén, L., Wei, T., Heilborn, J., Frohm-Nilsson, M., Granath, F. & Ståhle, M. (2010). Injury downregulates the expression of the human cathelicidin protein hCAP18/LL-37 in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 19: 442-449.
- Marsella, R. (2012). An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2012: 85-91.
- Marsella, R., Samuelson, D. & Doerr, K. (2010). Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21: 81-88.
- Marsella, R., Sousa, C. A., Gonzales, A. J. & Fadok, V. A. (2012). Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241: 194-207.
- Merryman-Simpson, A.E., Wood, S.H., Fretwell, N., Jones, P.G., McLaren, W.M., Mcewan, N.A., Clemets, D.N., Carter, S.D., Ollier, W.A. & Nuttall, T. (2008). Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Veterinary Dermatology*, 19: 59-66.
- Nuttall, T. (2013). The genomics revolution: will canine atopic dermatitis be predictable and preventable?. *Veterinary Dermatology*, 24: 10-18.
- Nuttall, T., Uri, M. & Halliwell, R. (2013). Canine atopic dermatitis – what have we learned?. *Veterinary Record*, 172: 201-207.
- Nuttall, T.J., Knight, P.A., McAlesse, S.M., Lamb, J.R. & Hill, P.B. (2002). T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87: 379-384.
- Olivry, T. (2011). Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis?. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144: 11-16.
- Ong, P. Y. (2014). New insights in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Pediatric Research*, 75: 171-175.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L. & Leung, D.Y.M. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, 347: 1151-1160.
- Oyoshi, M. K., Larson, R. P., Ziegler, S. F. & Geha, R. S. (2010). Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a TH2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126: 976-984.
- Reiter, L. V., Torres, S. M. & Werts, P. W. (2009). Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Veterinary Dermatology*, 20: 260-266.

- Roediger, B., Kyle, R., Le Gros, G. & Weninger, W. (2014). Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy. *Current Opinion in Immunology*, 31: 108-114.
- Santoro, D., Marsella, R., Ahrens, K., Graves, T.K. & Bunick, D. (2013). Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24: 329-336.
- Shan, Y., Chang Ook, P., Shin, J.U., Noh, J.Y., Lee, Y.S., Lee, N., Kim, H.R., Noh, S., Lee, Y., Lee, J.H. & Lee, K.H. (2014). DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 23: 938-941.
- Shimada, K., Yoon, J., Yoshihara, T., Iwasaki, T. & Nishifuji, K. (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 20: 541-546.
- Shiraishi, H., Masuoka, M., Ohta, S., Suzuki, S., Arima, K., Taniguchi, K., Aoki, S., Toda, S., Yoshimoto, T., Inagaki, N., Conway, S.J., Narisawa, Y. & Izuhara, K. (2012). Periostin Contributes to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis by Inducing TSLP Production from Keratinocytes. *Allergy International*, 61: 563-572.
- Sugiura, H., Ebise, H., Tazawa, T., Tanaka, K., Sugiura, Y., Uehara, M., Kikuchi, H. & Kimura, T. (2005). Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *British Journal of Dermatology*, 152: 146-149.
- Van Damme, C.M.M., Willhemse, T., Van Dijk, A., Haagsman, H.P. & Veldhuizen, E.J.A. (2009). Altered cutaneous expression of beta-defensins in dogs with atopic dermatitis. *Molecular immunology*, 46: 2449-2455.
- Verthagen, J., Akdis, M., Traidl-hoffmann, C., Schmid-grendelmeier, P., Hijnen, D., Knol, E.F., Behrendt, H., Blaser, K. & Akdis, C.A. (2006). Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117: 176-183.
- Wollenberg, A., R  wer, H.-C. & Schaubert, J., (2011). Innate Immunity in Atopic Dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 41: 272-281.
- Wood, S.H., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. & Carter, S.D. (2010). Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138: 193-197.
- Wood, S.H., Clements, D.N., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. & Carter, S.D. (2009). Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of Dermatological Science*, 55: 27-33.