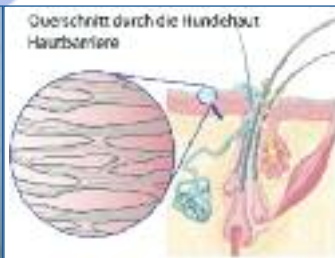




Abschlussbericht

Schützender Fettfilm

aus der gkf-Info 38 | Dezember 2013



Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung



Forschung
für den Hund

Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V.

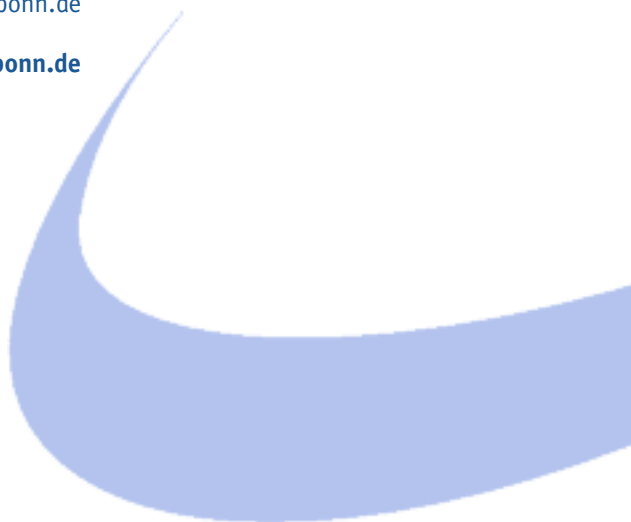
Postfach 14 03 53

53058 Bonn

Service-Telefon 0180/3 34 74 94

info@gkf-bonn.de

www.gkf-bonn.de



Abschlussbericht

Schützender Fettfilm

Eine Arbeitsgruppe um Reinhard Mischke, Mandy Angelbeck-Schulze und Wolfgang Bäumer an der TiHo Hannover entwickelte mit der „skin-scrub“-Technik eine neue Methode der Gewinnung von Hautfetten beim Hund. Die schmerzlose „skin-scrub“ Technik hilft bei der zukünftigen Erforschung der Hautbarriere bei allergisch bedingten Hautkrankheiten. Mit der neuen Methode konnte die Hannoveraner Arbeitsgruppe bereits Erkenntnisse über das Hautfettmuster bei gesunden und bei kranken Hunden sammeln, die möglicherweise zur Entwicklung medizinischer Lotionen zur Behandlung allergischer Hautkrankheiten beitragen können.

Hunde mit einer Atopie reagieren auf an sich harmlose Stoffe in der Umwelt, wie beispielsweise Pflanzenpollen, allergisch. Wenn sie mit den allergieauslösenden Stoffen (Allergenen) in Berührung kommen, leiden diese Tiere unter starkem Juckreiz und Entzündungen der Haut (s. Kasten 1). Bei vielen atopischen Hunden kann man die allergischen Reaktionen mit einer allergen-spezifischen Immuntherapie (ASIT) unter Kontrolle bringen, aber leider nicht bei allen.

Diese Tiere müssen in der Regel lebenslang mit entzündungshemmenden und juckreizlindernden Medikamenten behandelt werden. Da diese Arzneimittel insbesondere im Dauereinsatz auch erhebliche Nebenwirkungen haben können, sucht man nach Mög-

lichkeiten, wie man den Einsatz dieser Medikamente verringern kann. Diese Suche wird jedoch dadurch erschwert, dass man die krankhaften Vorgänge bei einer Atopie noch nicht im Einzelnen kennt.

Beispielsweise weiß man, dass bei Atopikern der natürliche Schutzwall der Haut, die Hautbarriere (s. Kasten 2), durchlässiger ist und damit ihre Schutzfunktion teilweise eingebüßt hat. Man nimmt an, dass dieser Funktionsverlust mit den speziellen Fetten (Lipiden) der Haut beziehungsweise der Zusammensetzung dieser Fette zu tun hat. Wie diese jedoch genau verändert sind, ob das wiederum eine Ursache oder eine Folge der Atopie ist und wie bedeutend die Veränderungen für den Krankheitsverlauf sind – all dies und noch viel mehr sind offene Fragen.

Tatsächlich steht diese Forschungsrichtung gerade beim Hund noch ganz am Anfang. Bisher wurden für die Gewinnung der Hautlipide recht unterschiedliche Probenahme-Techniken verwendet, die sich auch deutlich in ihrer Schädigung auf die Haut (Invasivität) unterschieden. Bis die Hannoversche Arbeitsgruppe die „skin scrub“-Technik entwickelte, fehlte eine praktikable und minimal-invasive Technik um aussagekräftige und einheitliche Proben der Hautfette zu entnehmen, die gleichzeitig eine ausreichend große Lipidmenge für Mehrfachbestimmungen lieferten.

Entwicklung der „skin scrub“-Technik

Die Entwicklung einer neuen Probenahme-Technik war nötig, weil die bislang üblichen Methoden, die Entnahme von Gewebeprobe in Form kleiner Hautstückchen (Biopsien) und Hautgeschabsel, fehleranfällig waren und unterschiedliche Ergebnisse lieferten.

Bei den Biopaten musste die Oberhaut mit der Hautbarriere vor der Analyse erst mit einem komplizierten Hitze-Verfahren von der darunterliegenden Lederhaut getrennt werden. Dieser Arbeitsschritt erwies sich als sehr fehleranfällig. Denn die uneinheitlichen Ergebnisse der anschließenden Analyse lassen vermuten, dass sich in manchen Proben doch noch Lederhaut befand.

Canine Atopische Dermatitis

Mit Atopie bezeichnet man die Neigung auf harmlose Stoffe aus der Umwelt (zum Beispiel Blütenpollen) allergisch zu reagieren. Bei Hunden führt der Kontakt mit dem allergieauslösenden Stoff (Allergen) in der Regel zu stark juckenden Hautentzündungen an den Ohren, dem palmaren Metakarpus (Rückseite der Mittelhand am Vorderbein), den Achseln, der Leistengegend und den Lefzen. Man nennt dieses Krankheitsbild Canine Atopische Dermatitis (CAD).

Eine CAD kann nur im Ausschlussverfahren diagnostiziert werden. Zu den Differenzialdiagnosen der CAD zählen beispielsweise Parasitenbefall oder Hautinfektionen. Erschwert wird die Diagnose häufig dadurch, dass mehrere Ursachen gleichzeitig für die Symptome verantwortlich sein können. So kann ein Hund mit einer Allergie auf Gräserpollen gleichzeitig auch Flöhe haben. Gar nicht so selten sind auch allergische Reaktionen auf mehrere Stoffe, zum Beispiel eine Pollenallergie in Verbindung mit einer Allergie auf bestimmte Eiweiße in der Nahrung (Futtermittelallergie).

Wenn man das Allergen kennt, ist in vielen Fällen eine Allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT) möglich. Dabei wird dem Allergiker das Allergen in minimalen aber steigenden Mengen verabreicht. Auf diese Weise soll sich das Immunsystem an das Allergen „gewöhnen“, sodass es schließlich nicht mehr darauf reagiert. Viele Patienten werden durch eine ASIT symptomfrei, bei anderen treten die Symptome zumindest schwächer und/oder seltener auf. Begleitend sollte zur Unterstützung der Hautbarriere immer eine lokale Therapie in Form von Shampoos oder Lotionen erfolgen. Diese Behandlung wird umso wichtiger, wenn eine ASIT nicht möglich ist oder der Hund trotz ASIT weiterhin unter Entzündungen und Juckreiz leidet. In diesem Fall müssen oftmals auch immunsuppressive oder -modulierende Arzneimittel wie beispielsweise Glukokortikoide, Ciclosporin und/oder Antihistaminika eingesetzt werden, um die Symptome zu lindern. Nahrungsergänzungsmittel wie zum Beispiel Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl können unterstützend wirken.

Die Hautbarriere

Die Hautbarriere verhindert einerseits das Austrocknen der Haut und andererseits schützt sie den Körper vor dem Eindringen von fremden Substanzen und Krankheitserregern. Sie besteht im Wesentlichen aus Schichten verhornter Hautzellen und verschiedenen Fetten (Lipide). Zu den Fetten der Hautbarriere gehören Cholesterine, Triglyzeride und Ceramide. Dabei stellen die Ceramide sowohl funktionell als auch mengenmäßig die bedeutendste Gruppe dar. Sie bilden den Kitt, der die verhornten Hautzellen fest zusammenhält und die Haut nach außen hin abdichtet. Man teilt die Ceramide in unterschiedliche Klassen ein. Bislang sind elf Ceramid-Klassen beim Hund bekannt.



In der Lupenvergrößerung sind die Ceramide als blaue Fäden dargestellt, die die abgestorbenen und verhornten Hautzellen wie ein Kitt zusammenhalten. Ceramide, andere Hautlipide und die verhornten Hautzellen dichten die Haut nach außen ab. Abdruck der Grafik mit freundlicher Genehmigung von Royal Canin

Mit den Hautgeschabseln konnte einerseits manchmal nicht genügend Probenmaterial für die Analyse gewonnen werden und andererseits bestand die Möglichkeit, dass das Material durch Blut verunreinigt war. Je nach verwendeter Methode unterschieden sich die ermittelten Werte erheblich, so dass Ergebnisse von Studien, die mit verschiedenen Probenahme-Techniken gearbeitet haben, nicht miteinander verglichen werden konnten. Aus diesem Grund konnten bisher keine verlässlichen Standardwerte für die Hautlipide des Hundes ermittelt werden.

Bei der „skin-scrub“-Technik handelt es sich um eine Anpassung einer bereits bestehenden Methode zur Gewinnung der Hautflora bei Hund und Mensch namens „cup-scrub“.

Um unter kontrollierten und nachvollziehbaren Bedingungen Lipide aus der Haut zu lösen, wird bei der „skin-scrub“-Technik ein Metallzylinder mit einem Innendurchmesser von 21 Millimetern fest auf die Haut gedrückt. In den Zylinder füllt man einen Milliliter Lösungsmittel. Nach einer kurzen Einwirkzeit wird dann das Lösungsmittel mitsamt der darin gelösten Hautfette in ein Glasröhrchen überführt.

„Skin scrub“ im Test

Um herauszufinden, ob die „skin scrub“-Technik gleichwertig oder besser als die herkömmlichen Methoden der Hautfettbestimmung ist, nahmen die Forscher an fünf toten Hunden mit gesunder Haut mit jeder Technik je drei Proben zum einen von der Haut der Kruppe und zum anderen von der Leistengegend. Alle Hunde stammten aus



Atopische Dermatitis bei einem jungen Deutschen Schäferhund: Haarverlust, Rötung, Erosion, verstärkte Hautmaserung und Pigmenteinlagerung sind keine direkte Folge der Krankheit. Die Hautveränderungen sind vielmehr sekundär entstanden weil das Tier die juckenden Hautstellen intensiv durch Lecken und Kratzen bearbeitet hat.

dem Klinikbetrieb und waren aus von der Untersuchung unabhängigen Gründen verstorben. Anschließend wurden alle Proben mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) in Kombination mit Massenspektrometrie analysiert (s. Kasten 3). Im Ergebnis konnten neun verschiedene Ceramidklassen in den Proben festgestellt und Hinweise auf zwei weitere gefunden werden. Bei der Auswertung der drei verschiedenen Methoden zeigte sich auch, dass die „skin scrub“-Technik den anderen Methoden überlegen war. Denn sie erlaubte eine hohe Ausbeute an Hautlipiden und war dabei weniger invasiv. Daher wurde bei den folgenden Untersuchungen nur noch die „skin scrub“-Technik eingesetzt.

Unterschiede des Hautfettmusters in verschiedenen Körperregionen

Bei einer Atopie treten die Hautveränderungen bevorzugt an bestimmten Körper-

stellen auf: Nämlich Ohren, an der Rückseite der Mittelhand (palmarer Metakarpus), den Achseln, der Leistengegend und den Lefzen. Die Arbeitsgruppe fragte sich, ob das typische Atopie-Verteilungsmuster eventuell bereits an Unterschieden im Hautfettmuster bei Tieren mit gesunder Haut ablesbar ist. Um das herauszufinden, untersuchten die Forscher das Hautfettmuster an fünf für die Atopie typischen Lokalisationen sowie an drei weiteren Körperstellen, die bei einer Atopie in der Regel unverändert bleiben (der seitlichen Brust- und Bauchwand sowie der Kruppe). Die Proben wurden bei acht aus von der Studie unabhängigen Gründen verstorbenen Hunden mit gesunder Haut entnommen.

Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass das Hautfettmuster je nach Körperstelle unterschiedlich ist. Aber es zeigte sich auch, dass die für die Atopie charakteristischen Lokalisationen beim gesunden Hund kein typisches Hautfettmuster aufweisen. Es besteht also zumindest beim Hund kein Zusammenhang zwischen dem Hautfettmuster



Probenahme mittels „skin scrub“-Technik bei einem Dalmatiner mit atopischer Dermatitis, gezeigt an der unauffälligen Haut an der seitlichen Brustwand. (a. Auftragen des Lösungsmittels; b. Verrühren des Lösungsmittels auf der Haut mit angerautem Glasstab)

einer bestimmten Hautregion und der Entstehung von Veränderungen durch eine Atopie. Doch trifft das auch beim Vergleich gesunder und kranker Hunde zu?

Unterschiede bei gesunden und bei kranken Tieren

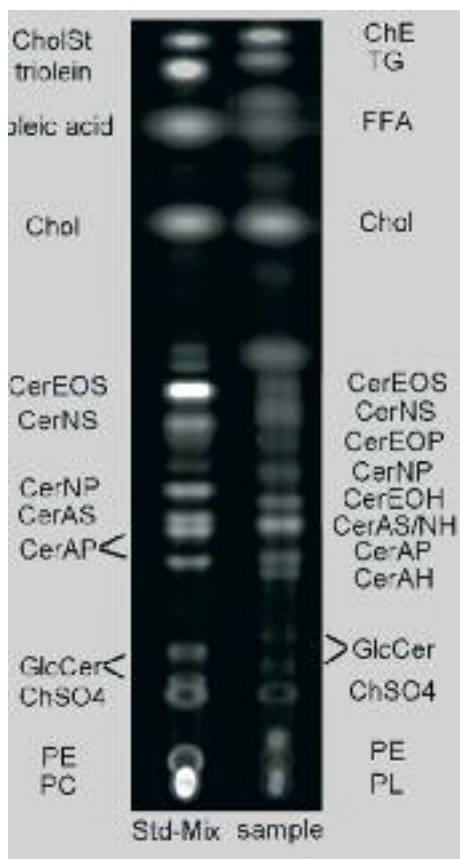
Um festzustellen, welche Unterschiede zwischen den Lipidmustern der Haut von gesunden und kranken Hunden bestehen beziehungsweise, ob es auch Unterschiede der Hautfettmuster bei unterschiedlichen Krankheiten gibt, untersuchten die Forscher 27 lebende Hunde. Zwölf der Tiere litten unter einer atopischen Dermatitis. Von diesen Tieren nahmen die Wissenschaftler je eine Probe klinisch unauffälliger Haut und veränderter Haut.

Dabei stellten sie fest, dass die Gesamtlipidmenge bei den Atopikern auch in der unveränderten Haut signifikant niedriger war als bei gesunden Hunden. Bei den Hautveränderungen war die Gesamtlipidmenge

noch geringer. Die Ergebnisse zeigten dabei keinen Unterschied zwischen Atopikern mit und ohne Futtermittelallergie. Das Lipidmuster war bei den Atopikern – bis auf geringe Abweichungen bei den Ceramiden – dem Hautfettmuster von gesunden Hunden sehr ähnlich.

Ähnliche Veränderungen des Hautfetts wie die Atopiker zeigten auch Hunde mit einer allergischen Flohdermatitis (FAD) oder einer Kontaktdermatitis. Das werten die Wissenschaftler als Hinweis auf einander entsprechende Prozesse im Krankheitsverlauf bei allergisch oder immunologisch vermittelten Entzündungen.

Tatsächlich zeigte sich bei der granulomatösen Sebadenitis, einer Krankheit, bei der die Talgdrüsen der Haut zerstört werden, ein anderes Bild. Hier gab es keine Veränderung des Ceramidgehalts oder -profils gegenüber gesunder Haut. Dafür traten jedoch stark herabgesetzte Mengen an freien Fettsäuren, Triglyzeriden und Cholesterolestern auf.



HPTLC-Auftrennung der Lipidfraktionen aus Hundehaut, die mittels "skin scrub" gewonnen wurden, sowie der korrespondierenden Standards. (PC, Phosphatidyl-g-cholin; PE, Phosphatidylethanolamin; ChSO₄, Cholesterol-Sulfat; GlcCer, Galactocerebroside; Cer, Ceramide; CholST, Cholesteryl-Stearat; Std-Mix, Standard-Mix; PL, Phospholipide; FFA, freie Fettsäuren; TG, Triglyceride; ChE, Cholesteryl-Ester).

Verfahren zur Analyse der Hautlipide

Die **Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)** ist ein chemisch-physikalisches Trennverfahren, das sich das unterschiedliche Verhalten von verschiedenen Molekülen (Teilchen) auf einer Trägersubstanz zunutze macht. Gibt man eine Flüssigkeit mit unterschiedlichen chemischen Stoffen auf eine Trägersubstanz, sammeln sich alle gleichen Moleküle aufgrund ihres gleichen Verhaltens in einer so genannten Bande. Als Ergebnis der HPTLC erhält man ein Bandenmuster. Zur Bestimmung der Banden nutzt man Standardlösungen mit bekanntem Inhalt, die man auch durch die HPTLC laufen lässt. So erhält man ein Bandenmuster mit bekannten Stoffen. Dieses vergleicht man dann mit der Probe. Dabei kann man davon ausgehen, dass alle Banden auf gleicher Höhe vom gleichen Stoff stammen. Da es nicht für alle Ceramid-Klassen entsprechende Standardlösungen gab, kombinierten die Forscher die HPTLC mit einer **Massenspektrometrie**, mit deren Hilfe Atome und Moleküle anhand ihrer Massen aufgetrennt werden und so identifiziert werden können.

Fazit

Die Studie der Hannoveraner Arbeitsgruppe zeigt, dass die Ergebnisse bei der Messung von Hautlipiden in hohem Maße von der Technik der Probenahme abhängen. Auch die ermittelte Fettzusammensetzung kann je nach Probenahmet-Technik und Analyse-methode sowie in einem geringeren Maße je nach beprobter Körperregion variieren. Deshalb sind Vergleiche der Ergebnisse verschiedener Studien schwierig.

Die neue „skin scrub“ Technik weist gegenüber den herkömmlichen Methoden entscheidende Vorteile auf. Denn sie erlaubt eine hohe Ausbeute an Hautlipiden und ist dabei weniger invasiv. Bei den Untersuchungen der lebenden Hunde provozierte die „skin scrub“-Technik kaum Abwehrbewegungen, dürfte kaum Schmerzen verursachen und erwies sich damit als sehr praktikabel. Nach der Probenahme waren die Hautstellen höchstens leicht gerötet, selten kam es zu Juckreiz und/oder einer Krustenbildung. Daher empfiehlt sich die „skin scrub“-Technik als neue Standardmethode zur Gewinnung von Hautfetten.

Bei gesunden Hunden gibt es keinen Hinweis darauf, dass das spezifische Hautfettmuster bestimmter Körperregionen das Risiko für allergische Reaktionen an diesen Stellen erhöhen könnte. Atopische Hunde weisen jedoch deutlich niedriger Hautlipidgehalte auf als Hunde mit gesunder Haut. Abgesehen von kleineren Abweichungen glich das Hautfettmuster von Atopikern weitgehend dem von gesunden Hunden.

Auch im Vergleich mit anderen Erkrankungen aus dem allergischen Bereich zeigten sich nur geringe Abweichungen. Allerdings wäre es eventuell sinnvoll auch diese Abweichungen bei der Entwicklung einer spezifischen Lipidmischung zur Unterstützung der Hautbarriere zu berücksichtigen. So könnte man sich bei Atopikern am Hautfettmuster gesunder Hunde orientieren. Bei Hunden mit einer allergischen Flohdermatitis wären hingegen eventuell höhere Ceramid- und Cholesterolanteile und bei einer Kontaktdermatitis höhere Ceramidanteile zu empfehlen.

Titel der Studie

Das Lipidmuster der caninen Epidermis - Vergleichende Untersuchungen bei Hunden mit unterschiedlichen Hauterkrankungen

Kontakt

Prof. Dr. Reinhard Mischke
 Klinik für Kleintiere
 Stiftung Tierärztliche Hochschule
 Hannover
 Bünteweg 9
 30559 Hannover
 0511 / 9536405
 Reinhard.Mischke@tiho-hannover.de
 Es bestand eine enge Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie (Prof. Dr. Wolfgang Bäumer) und dem Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. Hassan Naim).