

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Anja V. Ilić Božović

POKAZATELJI SISTEMSKE INFLAMACIJE I NIVO
HOMOCISTEINA KOD PASA SA ATOPIJSKIM
DERMATITISOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Anja V. Ilić Božović

INDICATORS OF SYSTEMIC INFLAMMATION AND
HOMOCYSTEINE LEVEL IN DOGS WITH ATOPIC
DERMATITIS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Članovi komisije

Mentor 1

Dr Milica Kovačević Filipović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Mentor 2

Dr Anđelo Beletić, viši naučni saradnik i specijalista medicinske biohemije,
Univerzitetski klinički centar Srbije, Centar za medicinsku biohemiju

Dr Vanja Krstić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Zorana Milanović, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke Vinča

Mesto i datum odbrane

Istraživanja sprovedena u ovoj tezi podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

The thesis was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143)

Nga mihi kiki!

Za tatu...

Sažetak

Uvod: Patogeneza atopijskog dermatitisa (AD) pasa se zasniva na lokalnoj inflamaciji usled poremećaja imunskog sistema kože u kompleksu sa izmenjenom građom epidermisa.

Cilj: Hronična priroda i zahvaćenost velike površine kože, navode na pitanje da li se i u kolikoj meri javlja sistemska reakcija, i koliko je ta reakcija slična, reakcijama koje se javljaju kod drugih hroničnih i akutnih inflamatornih stanja.

Materijal i metode: U ovu opservacionu studiju preseka su uključeni psi brahicefaličnih (n=18) i mezocefaličnih (n=36) rasa kojima je dijagnostikovano atopijski dermatitis, psi sa asimptomatskom srčanom dirofilariozom (n=31), babezozom (n=12), piometrom (n=8) kao i kontrolni psi (n=30). Osim rutinskih hematoloških i biohemijskih analiza, u serumu su određeni koncentracija serum amiloida A (SAA) i apolipoproteina A1 (ApoA1) enzimskim imunometrijskim testom, ceruloplasmina (CER) i paraoksonaze 1 (PON1) spektrofotometrijski, lipoproteinske frakcije su razdvojene elektroforezom na agaroznom gelu, a homocistein (Hcy) je određen hemiluminiscentnom imunometrijskom metodom. Razlike između varijabli ispitane su pomoću Kruskal-Wallis testa sa *post-hoc* analizom po Conover-u, i Mann-Whitney U testa. Veze između varijabli kvantifikovane su Spearman-ovim koeficijentima korelacije i multiplom regresionom analizom.

Rezultati: Rezultati su pokazali viši broj eritrocita (P=0,002), veći hematokrit (P=0,026) i indeks anizocitoze (P<0,001), veći broj eozinofila (P=0,002), i veću prosečnu zapreminu trombocita (P=0,023) kod pasa sa AD u odnosu na kontrolne pse. Koncentracija ukupnih proteina (P=0,018), globulina (P=0,002) i glukoze (P=0,008) je bila viša, dok je koncentracija holesterola (P<0,001) i zastupljenost frakcije lipoproteina velike gustine 1 (*high-density lipoproteins* 1 — HDL1) (P=0,009), bila niža kod pasa sa AD u poređenju sa zdravim psima. Koncentracija SAA, ApoA1 i aktivnost PON1 se nisu razlikovale, ali je CER bio viši kod pasa sa AD (P=0,006), kao i indeks akutne faze (SAA×CER)/(PON1×Albumin) (P=0,006). U okviru grupe pasa sa AD, brahicefalične rase su imale niži broj eritrocita (P=0,018), višu vrednost prosečne koncentracije hemoglobina po eritrocitu (P<0,001), viši broj neutrofila (P=0,005) i trombocita (P=0,004) nego psi mezocefaličnih rasa. Biohemijski parametri kao i pokazatelji inflamacije se nisu razlikovali, ali su psi brahicefaličnih rasa imali više koncentracije Hcy (P=0,022), a pripadnost tim rasama predstavljala je nezavisni prediktor njegove koncentracije (P=0,021). Kod pasa sa AD utvrđena je nezavisna negativna korelacija između koncentracije CER i zastupljenosti HDL1 (r=-0,364, P=0,044), kao i nezavisna pozitivna između indeksa akutne faze i koncentracije ApoA1 (r=0,489, P=0,004). Analiza medijane i minimalnih i maksimalnih vrednosti koncentracije SAA u grupi pasa sa dirofilariozom je pokazala prisustvo inflamacije niskog intenziteta [2,79 (0,00–114,21 mg/L)], u grupi pasa sa babezozom umerenog intenziteta [347,00 (71,00–820,00 mg/L)] i u grupi sa piometrom jakog intenziteta [866,00 (242,00–1066,83 mg/L)]. Koncentracija Hcy je bila niža kod pasa sa jačim intenzitetom inflamacije koja je bila izazvana infekcijom mikroorganizmima i parazitima, a SAA i Hcy su bili u negativnoj korelaciji (r=-0,502, P<0,001). Svi parametri koji su bili u pozitivnoj ili negativnoj korelaciji sa SAA imali su obrnutu korelaciju sa Hcy. Poređenjem vrednosti za Hcy i SAA kod svih ispitivanih grupa pasa koje su činile pojedine patološke entitete, utvrđeno je da se koncentracija Hcy ne razlikuje između pasa sa AD, dirofilariozom i babezozom, ali je bila niža kod pasa sa piometrom (P=0,019), dok se SAA nije razlikovao između pasa sa AD i dirofilariozom, ali je bio niži nego kod pasa sa babezozom i piometrom (P<0,001). Na celokupnom uzorku dobijenom spajanjem grupa pasa sa AD i “inflamatornim” entitetima potvrđena je negativna korelacija između koncentracija Hcy i SAA (r=-0,440, P<0,001).

Zaključak: Psi sa atopijskim dermatitisom imaju sistemska hronična supklinička inflamacija koja se karakteriše porastom CER, određenim stepenom stresa i dislipidemijom, a bez promene koncentracije

Hcy. Posmatrano kroz prizmu supkliničkih i akutnih inflamacija umerenog i jakog intenziteta, Hcy se ne može smatrati potencijalnim biomarkerom hronične supkliničke inflamacije kod pasa. Ipak, porast koncentracije Hcy kod pasa brahicefaličnih rasa koji boluju od AD omogućava dalje razmatranje njegove uloge u patogenezi ovog stanja kod predisponiranih rasa pasa.

Ključne reči: atopijski dermatitis, brahicefalične rase, mezocefalične rase, sistemska inflamacija, stres, homocistein, ceruloplasmin, dislipidemija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Klinička dijagnostika, patologija i terapija životinja

Summary

Introduction: The pathogenesis of canine atopic dermatitis (AD) relies on local inflammation due to the skin's immune system dysfunction combined with the aberrant structure of the epidermis.

Objective: The chronic nature and the involvement of the large area of the skin raise the question of whether the systemic reaction occurs in AD cases, and if it does, what is the intensity and to which extent it resembles the reactions which characterize other chronic and acute inflammatory conditions.

Material and Methods: This observational cross-sectional study included brachycephalic (n=18) and mesocephalic (n=36) dogs diagnosed with atopic dermatitis, dogs with asymptomatic heartworm disease (n=31), babesiosis (n=12), pyometra (n=8), and healthy control dogs (n=30). Besides the routine hematology and biochemistry tests, laboratory methodology included measurement of the serum amyloid A (SAA) concentration, apolipoprotein A1 (ApoA1) concentration, using the enzyme-linked immunosorbent assays, determination of ceruloplasmin (CER) and paraoxonase 1 (PON1) level using the spectrophotometric methods, separation of the lipoprotein fractions using agarose gel electrophoresis, and measurement of the homocysteine concentration (Hcy) using the chemiluminescent immunoassay. The differences between the variables were tested using the Kruskal-Wallis test with the post-hoc analysis according to Conover and Mann-Whitney U test. The correlations between the variables were quantified with the Spearman rank correlation and multiple regression analysis.

Results: Results showed the higher erythrocyte count (P=0.002), hematocrit (P=0.026) and anisocytosis index (P<0.001), eosinophil count (P=0.002), and mean platelet volume (P=0.023) in AD dogs compared to the healthy controls. Concentrations of total proteins, (P=0.018), globulins (P=0.002), and glucose (P=0.008) were higher, while the cholesterol concentration (P<0.001) and the relative abundance of HDL1 (high-density lipoprotein 1) lipoprotein fraction (P=0.009) were lower in the AD dogs than in the healthy controls. Levels of SAA, ApoA1, and PON1 showed no difference, but CER (P=0.006) and the acute phase index (SAA×CER)/(PON1×Albumin) (P=0.006) had higher values in the dogs with AD. In the same group, the dogs of the brachycephalic breeds had lower erythrocyte count (P=0.018) than dogs of the mesocephalic breeds, while the mean corpuscular hemoglobin (P<0.001), neutrophil (P=0.005) and platelet count (P=0.004) were higher. The biochemistry results and levels of the inflammation indicators did not differ, but the brachycephalic dogs had higher Hcy levels (P=0.022), and the brachycephalic phenotype was the independent predictor of the Hcy concentration (P=0.021). Among the AD dogs, there was an independent negative correlation between CER concentration and the relative abundance of HDL1 (r=-0.364, P=0.044), and the independent positive correlation between the index of acute phase and concentration of ApoA1 (r=0.489, P=0.004). The median and minimum–maximum range of SAA showed the systemic inflammation of low grade in the group with heartworm disease [2.79 (0.00–114.21 mg/L)], moderate in the group with babesiosis [347.00 (71.00–820.00 mg/L)] and strong in the pyometra group [866.00 (242.00–1066.83 mg/L)]. The Hcy concentration was lower in dogs with stronger inflammatory reactions caused by bacterial and parasite infection, and a negative correlation existed between SAA and Hcy levels (r=-0.502, P<0.001). All parameters that correlated with SAA level also correlated with Hcy concentration, albeit the concentration was in the opposite direction. The comparison of Hcy and SAA levels between all included groups, which represented the separate pathologic entities, showed no difference in Hcy between the dogs with AD, heartworm disease, and babesiosis, but the dogs with pyometra had lower values (P=0.019). The concentration of SAA did not differ between the AD and heartworm groups, but those values were lower than the concentrations in the babesiosis and pyometra groups (P<0.001). Analysis of the integral sample, obtained by merging the AD group with the groups representing the “inflammation” entities, confirmed the negative correlation between Hcy and SAA concentrations (r=-0.440, P<0.001).

Conclusion: The dogs with AD have a subclinical chronic inflammation characterized by CER level increase, a certain extent of stress, and dyslipidemia, but without change in Hcy concentration. Considered via the spectrum of subclinical and acute inflammation of moderate and high intensity, Hcy could be regarded as a potential biomarker of chronic subclinical inflammation in dogs. Nevertheless, the increase in Hcy among the dogs of the brachycephalic breeds diagnosed with AD allows for further consideration of the role of Hcy in AD pathogenesis among the dog breeds with a higher susceptibility for this syndrome.

Keywords: atopic dermatitis, brachycephalic breeds, mesocephalic breeds, systemic inflammation, stress, homocysteine, ceruloplasmin, dyslipidemia

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Clinical diagnostics, pathology and therapy of animals

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Atopijski dermatitis.....	3
2.1.1. Patofiziologija atopijskog dermatitisa	3
2.1.1.1. Građa kože.....	3
2.1.1.2. Imunski sistem kože.....	9
2.1.2. Dijagnostika atopijskog dermatitisa.....	14
2.1.3. Terapija atopijskog dermatitisa.....	16
2.2. Sistemska inflamacija.....	16
2.2.1.Reaktanti akutne faze.....	17
2.2.1.1. Reakcija akutne faze kod atopijskog dermatitisa.....	19
2.2.2. Lipidni metabolizam i dislipidemija tokom inflamacije.....	20
2.2.2.1. Lipidni profil atopijskog dermatitisa.....	22
2.2.3. Sistemska inflamacija kod srčane dirofilarioze, babezioze i piometre.....	22
2.3. Homocistein.....	23
2.3.1. Homocistein i sistemska inflamacija.....	24
2.3.2. Homocistein i patološka stanja kože.....	25
3. CILJEVI DOKTORSKE DISERTACIJE.....	27
4. MATERIJAL I METODE.....	28
4.1. Životinje, eksperimentalne grupe.....	28
4.1.1. Kriterijumi za dijagnostiku atopijskog dermatitisa.....	28
4.1.2. Zdravi psi.....	28
4.1.3. Psi sa stanjima koje karakteriše različit intenzitet i dužina trajanja inflamatornog procesa.....	29
4.2. Osnovne hematološke i biohemijske analize.....	29
4.3. Elektroforeza lipoproteina.....	30
4.4. Određivanje koncentracije apolipoproteina A1.....	30
4.5. Određivanje koncentracije serum amiloida A.....	30
4.6. Određivanje koncentracije ceruloplazmina.....	31
4.7. Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1.....	31
4.8. Određivanje koncentracije homocisteina.....	31

4.9. Statistička obrada rezultata.....	31
5. REZULTATI.....	32
5.1. Rezultati u kontrolnoj i grupi pasa sa atopijskim dermatitisom.....	32
5.1.1. Hematološki pokazatelji.....	32
5.1.2. Biohemijski pokazatelji.....	34
5.1.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein.....	38
5.2. Rezultati u grupama pasa mezocefaličnih i brahicefaličnih rasa sa atopijskim dermatitisom.....	41
5.2.1. Hematološki pokazatelji.....	41
5.2.2. Biohemijski pokazatelji.....	44
5.2.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein.....	45
5.3. Korelacije pokazatelja sistemske inflamacije i homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom.....	48
5.3.1. Korelacije ispitane zajednički na svim grupama pasa uključenih u studiju sa atopijskim dermatitisom.....	48
5.3.2. Korelacije ispitane na grupi pasa sa atopijskim dermatitisom.....	49
5.4. Rezultati kod grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična inflamacija.....	52
5.4.1. Hematološki pokazatelji.....	52
5.4.2. Biohemijski pokazatelji.....	53
5.4.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein.....	54
5.5. Poređenje koncentracije pokazatelja inflamacije odnosno homocisteina između grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična inflamacija.....	56
6. DISKUSIJA.....	57
6.1. Anamnestičke, kliničke i demografske karakteristike grupe pasa sa atopijskim dermatitisom.....	57
6.2. Hematološke i biohemijske karakteristike, i lipidni status pasa sa atopijskim dermatitisom	57
6.3. Pokazatelji sistemske inflamacije.....	61
6.3.1. Serum amiloid A.....	61
6.3.2. Ceruloplazmin.....	62
6.3.3. Paraoksonaza 1.....	63
6.3.4. Indeks akutne faze.....	63
6.4. Homocistein.....	64
6.4.1. Homocistein kod pasa sa atopijskim dermatitisom.....	64

6.4.2. Homocistein kod pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična sistemska inflamacija.....	65
6.4.3. Poređenje rezultata kod grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična sistemska inflamacija.....	66
7. ZAKLJUČCI.....	68
8. LITERATURA.....	69

UVOD

Atopijski dermatitis pasa je genetski predisponirano oboljenje čija se patogeneza zasniva na reakciji prvog tipa preosetljivosti na alergene iz okruženja. Manifestuje se pruritičnim dermatitisom i često se komplikuje sekundarnim infekcijama kože. U revijalnom radu Hillier-a i Griffin-a (2001) navodi se da ne postoje sveobuhvatne studije koje bi iznale odgovarajuće podatke za prevalenciji i incidenciji ovog oboljenja kod pasa, ali da postoje mnoge studije ograničenog karaktera koje ukazuju da oko 20% pasa sa bilo kojim dermatološkim oboljenjem zapravo ima atopijski dermatitis, i da je incidencija atopijskog dermatitisa u porastu kod ljudi, ali i kod pasa. U okviru Nastavne bolnice za male životinje, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, već oko 30 godina radi Ambulanta za dermatologiju kućnih ljubimaca. Na osnovu podataka sakupljenih u toj ambulanti, jasno je da je broj pacijenata sa atopijskim dermatitisom u porastu. Na primer, 2008. je bilo 30 pacijenata, 2015. su to bila 104 pacijenta, a 2022. čak 220 pacijenata registrovanih sa dijagnozom atopijskog dermatitisa. U navedenom periodu je svakako došlo do poboljšanja dijagnostičkih procedura, te je to jedan od razloga povećanja broja pacijenata. Najverovatnije se povećao i broj pasa onih rasa koje su sklone atopijskom dermatitisu, a to su brahicefalične i mezocefalične rase. Kako je atopijski dermatitis sve češća dijagnoza u humanoj i veterinarskoj medicine, stručno i naučno interesovanje za ovo hronično oboljenje raste. Interesantan je podatak da u odnosu na druge vrste životinja, atopijski dermatitis kod pasa ima karakteristike koje se podudaraju sa istim oboljenjem kod ljudi, a to je pojava izraženog pruritusa, i spontani nastanak u ranijoj životnoj dobi. Ono što razlikuje tok bolesti kod pasa u odnosu na ljude, je to što kod pasa promene zahvataju samo kožu, dok se kod ljudi pojavljuje takozvani „atopijski marš“, odnosno vremenom se razvijaju alergijski rinitis i astma. Dalje, kod ljudi je dokazano da je atopijski dermatitis sistemsko oboljenje i da je predisponirajući faktor za razvoj drugih komorbiditeta, dok kod pasa još uvek nije pokazano u kojoj meri se atopijski dermatitis može smatrati sistemskim oboljenjem. Kod pasa i kod ljudi, u patogenezu atopijskog dermatitisa uključene su lokalne kožne promene: inflamacija, oksidativni stres i poremećaj u sastavu i funkciji lipida epidermisa.

Inflamacija je nespecifična reakcija tkiva na oštećenje. Intenzitet inflamacije se može proceniti na osnovu različitih markera, među kojima su proteini akutne faze (engl. *Acute Phase Proteins* - APP) najčešći. Na primer, kod ljudi i kod pasa se koristi C-reaktivni protein (CRP), ali se mogu primeniti i serum amiloid A (SAA), fibrinogen, haptoglobin ili ceruloplazmin. Koncentracija CRP-a i SAA brzo raste, ali brzo i opada posle oštećenja tkiva, dok koncentracija fibrinogena i ceruloplazmina sporije raste, ali duže se održava u cirkulaciji, te se ovi APP mogu smatrati pokazateljima hronične inflamacije. Lipidni profil plazme kod pasa se značajno razlikuje u odnosu na ljude. Specifičnost metabolizma lipida kod pasa u odnosu na ljude, je nedostatak holesterol estar transfer proteina koji omogućava da u ukupnim lipoproteinima plazme najveći udeo imaju lipoproteini velike gustine čiji je osnovni protein apolipoprotein A1 (ApoA1). Zbog toga bi promena njegove koncentracije, kao i zastupljenosti pojedinih lipoproteinskih frakcija u plazmi mogla odražavati suptilnije promene u metabolizmu lipida kod pasa. Takođe, postavlja se pitanje da li, i u kolikoj meri, baš ova razlika utiče na drugačije ishode atopijskog dermatitisa kod ljudi i kod pasa.

Kako postavljanje dijagnoze atopijskog dermatitisa kod pasa ima složenu proceduru, postojanje specifičnog biomarkera bi bilo od značaja za pacijente u veterinarskoj medicini. Atopijski dermatitis je multifaktorijalno oboljenje a na manifestaciju bolesti utiču i individualne karakteristike psa. Iako je kod ljudi koncentracija IgE antitela pouzdana dijagnostička metoda, kod pasa je porast IgE retko povezan sa atopijskim dermatitisom. U literaturi se može naići na podatke da su psi sa dermatitisom različite etiologije imali viši nivo homocisteina koji predstavlja neproteinsku aminokiselinu, koja nastaje od

metionina, esencijalne aminokiseline čiji je metabolizam nedvosmisleno važan za homeostazu kože, odnosno svih tkiva koja moraju stalno da se obnavljaju. Homocistein se kod ljudi povezuje sa psorijazom, ali ne i sa atopijskim dermatitisom. Ipak, psorijaza se kod pasa javlja relativno retko. Kod ljudi se visoke koncentracije homocisteina javljaju usled nedostatka vitamina B₁₂ i inflamacije. Još uvek nema jasnog objašnjenja da li je hiperhomocisteinemija uzrok ili posledica inflamatornih procesa. Suprotno, kod pasa koji imaju sindrom sistemskog inflamatornog odgovora postoji pad homocisteina. Najviše koncentracije homocisteina su ustanovljene kod pasa rase šar-pej koja se karakteriše najvećom površinom kože u odnosu na telesnu zapreminu kao i u grupi pasa sa heterogenim dermatološkim oboljenjima. Zbog potencijalnog značaja homocisteina za proliferaciju i diferencijaciju ćelija u tkivima koja se brzo obnavljaju, i na osnovu podataka koji su dobijeni u prethodnim istraživanjima vezanim za dermatološke probleme, ukazala se potreba određivanja koncentracije homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom, ali i da se ispita da li je eventualna promena njene koncentracije vezana za rase koje se smatraju brahicefaličnim, odnosno mezocefaličnim. Da bi se promene ove aminokiseline stavile u širi kontekst vezan za spektar inflamatornih stanja kod kojih oštećenje tkiva može biti ograničeno i blago, preko umerenog i izrazito jakog, odlučeno je da se koncentracija homocisteina i proteina akutne faze ispita kod pasa kod kojih je dijagnostikovana infekcija pojedinim mikroorganizmima i parazitima. Tako su u istraživanje uključeni psi sa dijagnozom: srčane dirofilarioze koji su imali hroničnu inflamaciju; babezioze izazvane protozom *Babesia canis* koji su imali akutnu inflamaciju umerenog intenziteta; i psi sa dijagnozom piometre koji su imali jaku akutnu inflamaciju. Na kraju, vrednosti homocisteina i proteina akutne faze, kao i dislipidemije kod atopijskog dermatitisa će biti razmatrane u kontekstu navedenog spektra oboljenja koja se karakterišu sistemskom inflamacijom, čime će se steći sveobuhvatan uvid u promene sistemskog karaktera koje se javljaju kod atopijskog dermatitisa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Atopijski dermatitis

Atopijski dermatitis je nasledni klinički sindrom, koji se karakteriše inflamatornim i pruritičnim alergijskim oboljenjem kože, nastalim na osnovu složene patogeneze koja uključuje prisustvo prvog tipa preosetljivosti najčešće na alergene iz okruženja (Halliwell, 2006). U revijalnom radu objavljenom 2001. godine, prevalencija atopijskog dermatitisa kod pasa sa bilo kojim dermatološkim oboljenjem iznosi oko 20% (Hillier i Griffin, 2001). Posle toga nisu objavljivane detaljnije originalne studije niti značajne meta-analize ali se smatra da je atopijski dermatitis sve češće dermatološko oboljenje kod pasa kućnih ljubimaca, ali i kod ljudi. Podaci govore da je kod ljudi prevalencija veća u razvijenim nego u nerazvijenim zemljama (Urban i sar., 2021). Kod odraslih ljudi se procenjuje da iznosi 2,1-4,9%, dok kod dece do 3 godine starosti dostiže i 20%. Takođe se smatra da je incidencija AD kod ljudi u porastu. Može se pretpostaviti da je slična situacija vezana i za populaciju pasa. Rase pasa koje su predisponirane za atopijski dermatitis su nemački ovčar, zlatni retriever, labrador retriever, bišon, bokser, francuski buldog, Džek Rasel terijer i zapadnoškotski terijer (Jaeger i sar., 2010).

2.1.1 Patofiziologija atopijskog dermatitisa

Atopijski dermatitis kod pasa nastaje kompleksnom interakcijom genetskih faktora i faktora iz okruženja koji utiču na imunski odgovor i funkciju kože kao barijere ka spoljašnjoj sredini. Danas je jasno da u osnovi problema leži poremećaj imunskog sistema kože u kompleksu sa izmenjenom građom epidermisa što narušava kožnu barijeru omogućavajući prodor antigena i stimulaciju imunskog sistema (Marsella, 2021; Thomsen, 2014).

2.1.1.1. Građa kože

Koža je najveći organ kod sisara i predstavlja anatomsku i fiziološku barijeru koja štiti organizam od spoljašnjih uticaja. Kožu čine tri sloja: pokožica ili epidermis – pločast slojevit orožali epitel; kržno ili dermis – vezivno tkivo koje pruža potporu epidermisu; supkutis ili hipodermis – sloj koji uglavnom čini masno tkivo spojeno sa fascijom (Marković i sar., 2016). Kod pasa koža je najtanja tamo gde je gust dlačni pokrivač. Njena debljina na tim mestima iznosi od 0,1 do 0,5 mm, dok je najdeblja na jastučićima šapa i nosnom ogledalu gde iznosi oko 1,5 mm (Scott, 2001).

Epidermis je sastavljen pretežno od keratinocita, koji su ektodermalnog porekla i nekeratinocita koji čine oko 15% ćelija ovog epitela. U nekeratinocite spadaju taktilne Merkelove ćelije, melanociti i antigen-prezentujuće Langerhansove ćelije (Arda i sar., 2014). Melanociti potiču od nervne kreste i obezbeđuju pigmentaciju kože. Langerhansove ćelije pripadaju mijeloidnoj ili limfoidnoj lozi i nastaju od matičnih ćelija hematopoeze. Epidermis je građen iz šest slojeva:

- *Stratum basale* čine progenitorski keratinociti koji predstavljaju osnovnu jedinicu koja obezbeđuje obnovu pokožice. Površinski slojevi pokožice se stalno odlupljuju te se moraju zameniti novim ćelijama koje kontinuirano nastaju deobom progenitorskih ćelija. Jedan ciklus smene ćelija traje tri do četiri nedelje. Ćelije *stratum basale* leže na dobro izraženoj bazalnoj membrani i u njima počinje

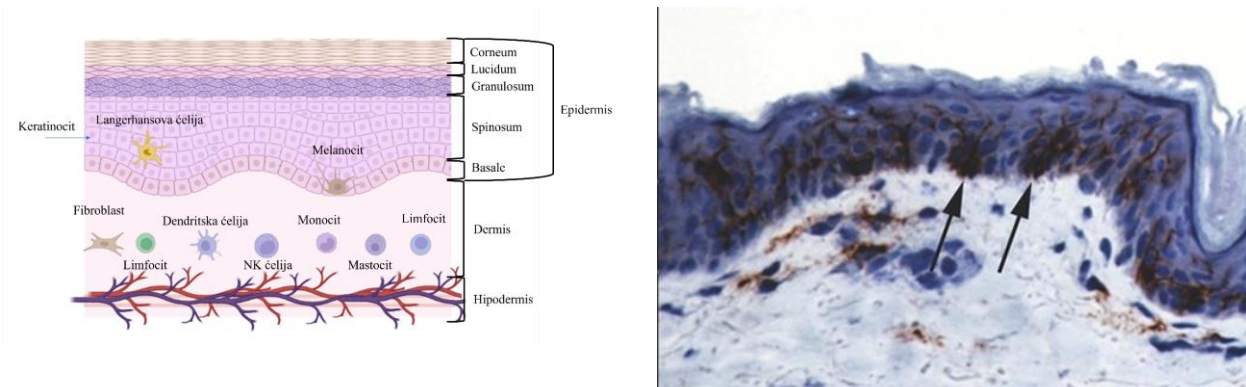
proizvodnja fibrilarnog proteina – keratina. Tokom migracije, nezreli keratinociti menjaju morfologiju i funkciju.

- *Stratum spinosum* čini nekoliko slojeva ćelija nepravilnog oblika koje su međusobno povezane površinskim procesusima ili intercelularnim mostovima, a koje predstavljaju keratinocite u procesu diferencijacije.
- *Stratum granulosum* čine dorzo-ventralno spljoštene ćelije sa malim jedrom. Citoplazma keratinocita ovog sloja sadrži bazofilne keratohijaline granule različitih veličina. U ovom sloju pojavljuju se specifične lamelarne granule ispunjene lipidima, čiji se broj povećava u narednim slojevima epidermisa.
- *Stratum lucidum* je sloj koji se može naći samo na mestima gde je koža zadebljala, sadrži mrtve i spljoštene keratinocite ispunjene proteinom eleidenom, derivatom keratohijalina.
- *Stratum corneum* je poslednji sloj i ima funkciju barijere koja sprečava isparavanje tečnosti i zaštitu od mikroorganizama i toksina. Sastoji se od 30-50 slojeva spljoštenih, potpuno keratinizovanih anukleisanih keratinocita, koji se u ovom, terminalnom stadijumu diferencijacije nazivaju korneociti. Oni su okruženi matriksom koji ima visok sadržaj neutralnih lipida i međusobno su povezani korneodezmozomima. Hidrofobni ekstracelularni lipidni matriks predstavlja osnovnu barijeru prolasku vode i elektrolita (Feingold, 2007). Sadrži imunoglobuline G (IgG), IgM i IgA klase, komponentu komplekta C3 i serumski albumin, kao i različite vrste keratina.
- *Stratum disjunctum* je sloj koji predstavlja odlubljene korneocite (Thomsett, 1986).

Matriks: tokom diferencijacije keratinociti proizvode lipide koje izlučuju u ekstracelularni prostor. Omega-hidroksi-ceramid se kovalentno vezuje za proteine na površini keratinocita i pravi skelet na koji se nadovezuje slobodni ceramid, slobodne masne kiseline i holesterol. Matriks epidermisa ima značajnu ulogu u zaštiti organizma od prodora (mikroorganizama, toksina, alergena i štetnih materija).

Dermis je potpora epidermisu, ima ulogu u zaštiti epidermisa od oštećenja i pritiska, i sadrži krvne i limfne sudove i nerve. Najdeblji je na mestima gde je dlaka najgušća. Izgrađen je od fibroblasta, kolagena, retikularnih i elastičnih vlakana. U površinskom sloju dermisa (*Stratum papillare*) u fiziološkim uslovima u rastresitom vezivnom tkivu nalaze se makrofagi, mastociti, plazmociti i dendritske ćelije, a kao odgovor na oštećenje i druge ćelije mogu migrirati u ovaj sloj (Thomsett, 1986). Dublji sloj dermisa (*Stratum reticulare*) je gusto iregularno vezivno tkivo bogato kolagenim vlaknima. Hipodermis – supkutis je građen od masnog tkiva, čija je uloga mehanička zaštita, energetska rezerva i izolacija. Derivati kože su lojne i znojne žlezde, dlačni folikuli i nokti.

Figura 1. Građa kože, šematski i histološki prikaz. Strelicama su obeležene Langerhansove ćelije.



Preuzeto i modifikovano iz Nestle i sar., (2009). Preuzeto iz Sparber, (2014).

Lipidni i proteinski sastav pokožice

Lipidni sastav

Glavne lipidne komponente pokožice su ceramid (50%), holesterol (25%) i slobodne masne kiseline (15%), sa izrazito malom količinom fosfolipida u poređenju sa svim drugim tkivima. Lamelarna tela su organele bogate enzimima neophodnim za sintezu matriksnih lipida. U te enzime spadaju lipidne hidrolaze, kao što su beta-glukocerebrozidaza, kisela sfingomijelinaza, sekretorna fosfolipaza A2 i neutralne lipaze. Osim enzima neophodnih za metabolizam lipida tu se nalaze i proteaze kao što su himotripsin i katepsin. Beta-glukocerebrozidaza konvertuje glukozilceramide u ceramide, kisela sfingomijelinaza transformiše sfingomijelin u ceramid, a fosfolipaza odvaja slobodne masne kiseline i glicerol od fosfolipida (Feingold, 2007).

Ceramidi su heterogena i kompleksna grupa sfingolipida. Kod ljudi, u epidermisu je ustanovljeno devet različitih supklasa ceramida (Bouwstra i Ponc, 2006). Ceramidi su najvažnija komponenta matriksa koja formira barijeru kože. Naime, omega-acil-ceramid se kovalentno vezuje za proteine te oko korneocita formira orožalu lipidnu ovojnicu koja ne dozvoljava promet vode i elektrolita (Coderch i sar., 2003; Feingold, 2011).

Holesterol je značajna komponenta ćelijskih membrana sisara i omogućava odgovarajuću fluidnost membrane. Ćelije epidermisa sintetišu sopstveni holesterol, ali mogu koristiti i holesterol iz lipoproteina plazme. Iako je holesterol najbitniji sterol *stratum corneum*-a, manje zastupljeni holesterol-sulfat igra ključnu ulogu u deskvamaciji korneocita. Količina holesterol-sulfata raste sa sazrevanjem keratinocita i najveća je u *stratum granulosum*-u, da bi se u gornjim slojevima *stratum corneum*-a opet vratila na nivo iz *stratum spinosum*-a. Holesterol-sulfat je inhibitor serin proteaze koja razgrađuje korneodezmozome i omogućava odlublivanje keratinocita. Zbog toga se smatra da u zavisnosti od lokalizacije ovaj metabolit može da stimuliše diferencijaciju keratinocita, ali da se u površinskim slojevima epidermisa njegovom razgradnjom zapravo omogućava deskvamacija korneocita. Za normalno funkcionisanje epidermalne barijere bitni su i enzim holesterol sulfo-transferaza koja sintetiše holesterol-sulfat, ali i enzim holesterol sulfataza koji ga razgrađuje (Elias i sar., 2014).

Masne kiseline su gradivne jedinice ceramida, fosfolipida i triglicerida, i uglavnom se sintetiziraju *de novo* u keratinocitima (Feingold, 2007). Citosolna masno-kiselinska sintetaza (engl. *Fatty Acid Synthase* – FAS) sintetizira masne kiseline sa 14-16 ugljenikovih atoma. Najviša aktivnost FAS je detektovana u *stratum granulosum*-u i opada ka gornjim slojevima *stratum spinosum*-a. Masne kiseline preuzete iz sistemskog krvotoka se metabolišu u masne kiseline dugih lanaca (C>18), i postaju zasićene. Tokom orožavanja keratinocita, masne kiseline kratkih lanaca se zamenjuju masnim kiselinama dugih lanaca. Najzastupljenije su masne kiseline koje se sastoje od 16-24 ugljenikova atoma, i to palmitinska, stearinska, oleinska, behenska i lignocerna kiselina. Ipak, keratinociti ne mogu sintetisati sve masne kiseline neophodne za normalnu funkciju epidermisa. Esencijalne masne kiseline za kožu su linoleinska, alfa-linoleinska i arahidonska (Khnykin i sar., 2011). Ako u molekulu ceramida usled nedostatka linoleinske kiseline dođe do njene zamene oleinskom dolazi do narušavanja zaštitne barijere kože (Wertz i sar., 1983). Masne kiseline obezbeđuju da pH *stratum corneum*-a bude slabo kiseo (pH=5,0-5,5), a to je dalje neophodno za optimalnu aktivnost enzima ovog sloja. Ukoliko pH vrednost poraste, aktiviraju se proteaze čija aktivnost narušava zaštitnu barijeru kože (Fluhr i sar., 2001). Pored gradivne uloge i uloge u skladištenju i stvaranju energije, masne kiseline mogu biti i signalni molekuli i mogu modifikovati druge signalne molekule u epidermisu (Khnykin i sar., 2011). Iz toga proističe da poremećaj u masnokiselinskom sastavu ima višestruke negativne posledice u formiranju zaštitne barijere kože.

Osim *de novo* sinteze, keratinociti koriste i molekule lipida čiji su izvor lipoproteini plazme. Tako, eksperimenti u kojima je inhibirana sinteza lipida u samom epidermisu pokazuju da keratinociti i dalje imaju određeni stepen regeneracije, što ukazuje da mogu koristiti lipide plazme za sintezu sopstvenih lipidnih struktura (Mao-Qiang i sar., 1993). Takođe, kada se holesterol sa obeleženim izotopom ugljenika aplikuje intravenski, ili kada se per oralno unesu esencijalne masne kiseline i biljni steroli, može se utvrditi da se oni ugrađuju u ćelije epidermisa (Feingold, 2007; Nikkari i sar., 1975). Nezreli keratinociti imaju receptore za lipoproteine male gustine (engl. *low-density lipoproteins* – LDL), ali ih gube sazревanjem (Mommaas-Kienhuis i sar., 1987; Ponc i sar., 1992). Na membrani keratinocita je eksprimiran i receptor “lešinar” tip B klase 1 (engl. *Scavenger Receptor Type B class 1* – SR-B1), koji ima funkciju transportera holesterola između lipoproteina velike gustine (engl. *high-density lipoproteins* – HDL) i ćelija i to u oba smera. Njegova ekspresija se smanjuje sa maturacijom keratinocita.

Keratinociti mogu sintetisati apolipoprotein E, kao i apolipoproteina AII (ApoAII) i SAA (Barra i sar., 1994; Fu i sar., 2001; Urieli-Shoval i sar., 1998). Bazalne ćelije epidermisa proizvode enzim lecitin holesterol acil transferazu koji pomaže konverziju holesterola u holesterol-estar i omogućava uklanjanje holesterola iz ćelija (Smith i sar., 1990). Iz svega navedenog proizilazi da je za održavanje homeostaze kože važan i sastav lipoproteina plazme.

Proteinski sastav

U koži se odvija 10-25% ukupnog metabolizma proteina (Biolo i sar., 1994). Iako dermis sadrži značajno više proteinske mase od epidermisa, u epidermisu se sintetizira deset puta veća količina proteina (Zhang i sar., 2003). Značaj metabolizma proteina u koži se može istaći ako se podvuče da se u uslovima gladovanja proteinska masa kože održava u uskim granicama, dok na primer proteinska masa skeletne muskulature može značajno varirati. Homeostaza proteinske mase kože je važna jer svako njeno narušavanje može da utiče na poremećaj u balansu vode i elektrolita i na poremećaj imunske funkcije kože koji za posledicu ima prodor mikroorganizama (Zhang i sar., 2003).

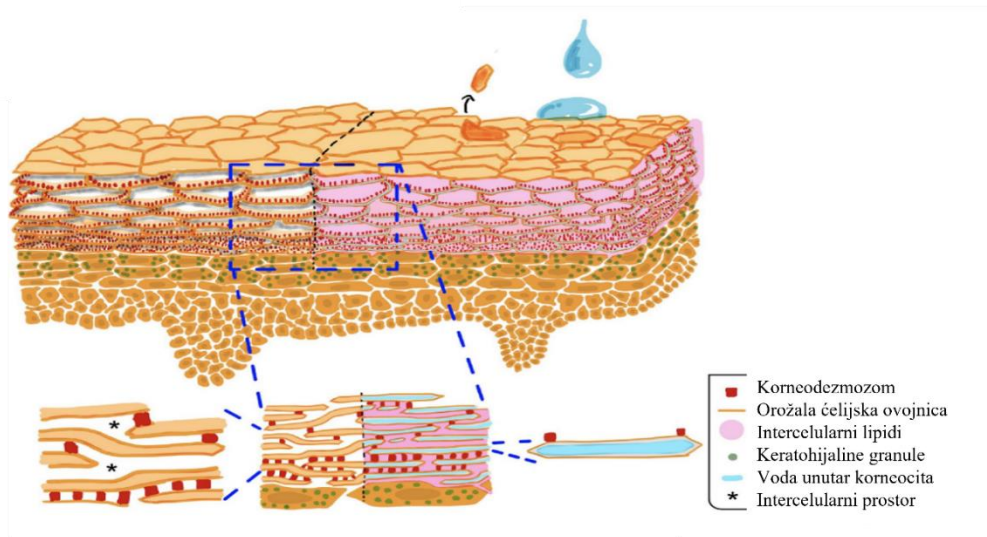
Oko 95% proteina epidermisa čini keratin, dok je drugi po zastupljenosti filagrin. U proteinski sastav kože takođe ulaze dezmozomalni proteini kao dezmoglein i dezmokolin, dezmolakin i drugi plakini kao i proteini orožale ovojnice u koje spadaju lorikrin, involukrin i mali proteini bogati prolinom (Presland i Dale, 2000).

Keratin je najzastupljeniji protein kože. Postoji više od 30 različitih molekula keratina. Dele se na dva tipa u zavisnosti od izoelektrične tačke. Tip I su kiseli molekuli male molekulske mase, a tip II su neutralni molekuli nešto veće molekulske mase. Specifičnost molekula keratina je da su teško rastvorljivi u vodi, slanim rastvorima i organskim rastvaračima, i otporni su na hidrolizu proteolitičkim enzimima, kiselinama i bazama. Aminokiseline cistin, cistein i metionin, koje se nalaze među onima koje grade molekule keratina, su bogate sumporom. Ka više diferenciranim slojevima epidermisa, u keratinizovanom materijalu se nalazi veća količina sumpora u formi disulfida. Disulfidne veze se smatraju odgovornim za nerastvorljivost i otpornost keratina na enzimske i hemijske agense, ali i za njegovu elastičnost. U procesu keratinizacije u kome se vijabilne epitelne ćelije transformišu u mrtvi rožnati materijal, nastaju keratinski intermedijarni filamenti. Intermedijarni filamenti se organizuju u snopove koji se nazivaju tonofilamenti, koji prave složenu mrežu citoskeleta keratinocita. Oni se prostiru kroz citoplazmu i povezuju se sa susednom ćelijom, indirektno preko veze tipa dezmozom. Daljim procesom maturacije dolazi do dezintegracije citoplazme i jedra, a ostaju tonofilamenti obloženi filagrinom. Osim toga, žive ćelije koje sadrže oko 70-80% vode se dehidriraju, te keratinizovane strukture imaju samo 10% vode (Deo i Deshmukh, 2018; Lorincz i Stoughton, 1958).

Filagrin je strukturni protein bogat histidinom koji učvršćuje tonofilamente u snopove po čemu je dobio ime na engleskom jeziku: *filament aggregating protein*. U keratohijalnim granulama se nalazi profilagrin koji defosforilacijom postaje filagrin. Filagrin pomaže stvaranje disulfidnih veza između keratinskih lanaca i tako omogućava remodelovanje keratina, povezuje keratinski citoskelet, i izaziva „kolabiranje” ćelija (Presland i Dale, 2000). Filagrin se potom razgrađuje do aminokiselina koje pripadaju faktorima koji održavaju “prirodnu vlažnost kože”. Osim tih aminokiselina, gliveril, urea, laktat i proizvod razgradnje glutamina čine osmotsku sredinu epidermisa takvom da on zadržava odgovarajuću količinu vlage (Cau i sar., 2017; Scott i Harding, 1986).

Orožala ovojnica se nalazi sa unutrašnje strane membrane keratinocita prilikom terminalne diferencijacije (Figura 2). Proteini koji učestvuju u formiranju orožale ovojnice se verovatno sintetišu još u bazalnom sloju. Lorikrin je protein bogat glicinom, serinom i cisteinom. Nalazi se u keratohijalnim granulama i formira fleksibilne strukture (Presland i Dale, 2000). Involukrin je drugi najzastupljeniji protein orožale ovojnice i sadrži glicin, lizin i glutamin. Lipidni molekuli koji se kovalentno vezuju za involukrin gradeći lipidnu orožalu ovojnicu na prvom mestu su ceramidi, a potom i holesterol-estri i slobodne masne kiseline (Presland i Dale, 2000).

Figura 2. Građa epidermalne barijere.



Preuzeto iz Murata i sar., 2022.

Promene strukture i sastava pokožice kod atopijskog dermatitisa

Narušavanje barijere kože omogućava lakši prodor antigena i senzibilizaciju. Narušena barijera kože podrazumeva promene samih keratinocita, ali i međucelijske supstance (Kim i Leung, 2018).

Većina patoloških stanja kože koja u osnovi imaju poremećaj barijere kože imaju smanjenje koncentracije ceramida i razlike u njegovom sastavu (Coderch i sar., 2003). Ceramidi su lipidi koji su među prvima povezani sa narušenom barijerom kože kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom. Ustanovljeno je da se problem javlja jer se smanjuje broj molekula ceramida sa izuzetno dugačkim lancima, preko 26 ugljenikovih atoma, a povećava broj njegovih molekula sa kratkim lancima (Bhattacharya i sar., 2019; Janssens i sar., 2012). To se povezuje sa smanjenom aktivnošću enzima za elongaciju masnih kiselina kao što su elongaze i povećanom aktivnošću desaturaza (Danso i sar., 2017). Osim toga, kod atopijskog dermatitisa dolazi do poremećaja metabolizma fosfolipida koji dovodi do njihove akumulacije u epidermisu (Bhattacharya i sar., 2019; Schafer i Kragballe, 1991). Holesterol-sulfat se nalazi u višim koncentracijama u koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom nego kod zdravih kontrola (Emmert i sar., 2021). Kod hiperplastičnih poremećaja sa narušenom barijerom kože, LDL receptori se zadržavaju i na diferentovanim/zrelim ćelijama *stratum spinosum*-a i *stratum granulosum*-a na kojima ih uobičajeno nema (Mommaas-Kienhuis i sar., 1987).

Količina ceramida, slobodnih masnih kiselina i holesterola je niža u koži pasa sa atopijskim dermatitisom, ali je količina glukozilceramida značajno viša nego kod zdravih pasa (Popa i sar., 2012). Kada se govori o promenama u masnim kiselinama, uočeno je da psi sa atopijskim dermatitisom imaju manje n-6 masnih kiselina u membranama eritrocita, dok masno-kiselinski sastav plazme nije bio različit u odnosu na kontrolne pse (Fuhrmann i sar., 2006; Sævik i sar., 2002). Ispitivanje izvedno na polju metabolomike je pokazalo da su kod pasa sa atopijskim dermatitisom u krvi redukovani glicerofosfolipidi i ceramidi, a povećani sfingolipidi (Franco i sar., 2021).

Mutacija na genu za filagrin je zajednička karakteristika 60% osoba kavkaskog tipa koje boluju od atopijskog dermatitisa (Hooper i Eggink, 2022). Ova mutacija je povezana sa atopijskim dermatitisom i kod drugih etničkih grupa, te se smatra da je ona glavni genetski predisponirajući faktor za razvoj atopijskog dermatitisa koji 3–5 puta povećava šansu za njegov razvoj (On i sar., 2017; Polcari i sar., 2014). Kod pasa se nailazi na oprečne rezultate kada je u pitanju povezanost pojave atopijskog dermatitisa i mutacije gena za filagrin (Combarros i sar., 2020). Metabolomičke analize su pokazale da se sastav aminokiselina menja u koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom. Metionin se nalazi u višim koncentracijama u koži sa lezijama nego u intaktnoj koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom ili u koži zdravih kontrola (Ilves i sar., 2021). Na modelu miša je pokazano da su u negativnoj korelaciji serumska koncentracija metionina i težina atopijskog dermatitisa, kao i da pretretman miševa metioninom može da spreči nastanak atopijskog dermatitisa, dok uvođenje metionina po pojavi znakova bolesti nema nikakvog efekta na njen dalji razvoj. Zaključak je da je nedostatak metionina bitan faktor za nastanak atopijskog dermatitisa (Koga i sar., 2021).

Ispoljavanje atopijskog dermatitisa se održava u začaranom krugu brojnih mehanizama koji se međusobno dopunjuju. Bez obzira na to što je primarni pokretač još uvek nepoznat, procesi koji dovode do manifestacije bolesti i njenog pogoršanja su lokalna inflamacija, oksidativni stres i lokalna dislipidemija, što su pokazale i metabolomičke analize kože (Ilves i sar., 2021). Ipak, ostaje nejasno u kojoj meri su svi navedeni problemi sistemskog karaktera i koliko su promene u lipidnom sastavu kože koje zavise od funkcije pojedinih enzima, možda povezane i sa funkcijom imunskog sistema kože.

2.1.1.2. Imunski sistem kože

Koža je u stalnom kontaktu sa mikroorganizmima te je i njen imunski sistem neprekidno aktivan. Koža kao posebna imunska celina je definisana dosta davno uvođenjem koncepta limfnog tkiva kože (engl. *Skin associated lymphoid tissue – SALT*) koje predstavlja specijalizovane difuzno raspoređene diskretne agregate limfocita i antigen-prezentujućih ćelija bez definisanih anatomskih celina (Sterlien, 1978). U koži i sluzokožama se nalazi najmanje ¼ svih limfocita u organizmu, što odlikava izuzetan značaj ovih tkiva u oblikovanju imunskog odgovora.

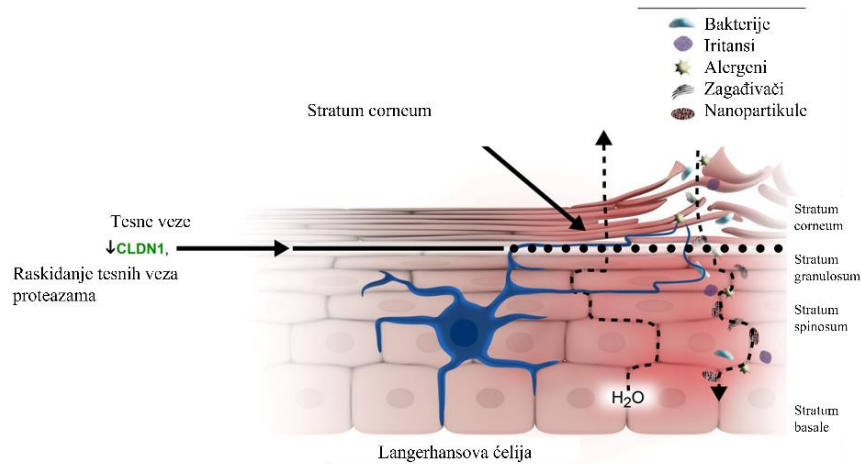
Dermis sadrži rezidentne antigen-prezentujuće ćelije u koje spadaju dendritske ćelije i tkivni makrofagi. Sadrži i mastocyte, kao i ćelije koje iz krvi migriraju u dermis – neutrofile, eozinofile, bazofile i limfocite. Iako epidermis nema direktnu komunikaciju sa krvotokom i limfotokom, on sadrži imunokompetente ćelije. To su Langerhansove ćelije i epidermiotropna populacija T limfocita, ali i keratinociti i melanociti. Imunski odgovor kože podrazumeva usklađenu aktivnost između ćelija epidermisa i dermisa koja odvija uz pomoć citokina (Salmon i sar., 1994), hormona i nervnog sistema (Arck i sar., 2006).

Ćelije epidermisa koje imaju ulogu u imunskom sistemu kože: Keratinociti imaju bitnu ulogu u imunskoj reakciji kože. Kada su direktno oštećeni ili aktivirani proinflamatornim stimulusima, sintetišu citokine iz familije interleukina (IL)-1. Ti interleukini aktiviraju T i B limfocite, pojačavaju imunostimulatorni potencijal dendritskih ćelija i promovišu citotoksičnu aktivnost monocita usmerenu na tumorske ćelije. Deluju na keratinocite, T limfocite, neutrofile, makrofage, fibroblaste i glatko-mišićne ćelije. Pojačavaju ekspresiju sopstvenih receptora na ciljnim ćelijama i indukuju sopstvenu sekreciju. Dva najbolje pručena citokina iz ove familije su IL-1 α i IL-1 β . Prvi dovodi do infiltracije neutrofila u epidermis, a uključen je i u nastanak inflamatornih lezija kod psorijaze. Drugi se oslobađa posredstvom aktivacije inflamazoma u keratinocitima pod dejstvom bilo kog štetnog faktora (Watanabe

i sar., 2007). Osim citokina iz familije IL-1, poznato je još najmanje 15 medijatora koje keratinociti mogu sintetisati. Među njima su: IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22 i TNF (*Tumor Necrosis Factor*)- α (Salmon i sar., 1994). Uz pomoć citokina, keratinociti mogu direktno uticati na ćelijski imunitet pojačavanjem ekspresije molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti II klase (engl. *Major histocompatibility complex class II molecules* – MHC II klase). Na neoštećenim keratinocitima postoje samo MHC molekuli I klase, dok u koži u kojoj se odigrava zapaljenska reakcija, infiltrirani T limfociti sekretuju interferon (IFN)- γ koji aktivira keratinocite koji onda eksprimiraju MHC molekule II klase. Keratinociti ne reaguju na fiziološki mikrobiom kože, ali se aktiviraju ukoliko su prisutni patogeni mikroorganizmi. Tada proizvode antimikrobne peptide u klasi defensina i katelicidina, koji su deo visoko očuvanog eukariotskog odbrambenog mehanizma. Ti antimikrobni peptidi se eksprimiraju na oštećenim keratinocitima kako bi sprečili invaziju mikroorganizama. Keratinociti takođe imaju značajnu ulogu u prepoznavanju iritantnih materija i toksina. Svaka izmena funkcije keratinocita može dovesti do narušavanja barijere kože (Das i sar., 2022). Ostaje otvoreno pitanje da li aktivacija keratinocita može da dovede do takvog obima lučenja citokina koji bi onda svojim endokrinim dejstvom izazvali sistemske efekte poput stvaranja pozitivnih proteina akutne faze u jetri i nastanka groznice.

Langerhansove ćelije su jedine prave antigen-prezentujuće ćelije koje se nalaze u epidermisu. Iako su prvi put opisane 1868. godine tek skoro su definitivno svrstane u ćelije hematopoetske loze (Otsuka i sar., 2018). Karakteristike Langerhansovih ćelija su dugo zbunjivale istraživače i nisu sa sigurnošću mogle biti svrstane niti u dendritske ćelije niti u tkivne makrofage. Naime, kao i dendritske ćelije, one migriraju u limfne čvorove i prezentuju antigen T limfocitima, ali kao i tkivni makrofagi održavaju svoju lozu lokalnom proliferacijom. Istraživanja ukazuju na to da je imunski odgovor pokrenut Langerhansovim ćelijama kompleksan i da zavisi od osobina antigena i lokalizacije stimulusa (Doebel i sar., 2017). Uobičajeno, dendritski nastavci ovih ćelija ne prolaze kroz tesne veze, ali kada su ove ćelije aktivirane citokinima, nastavci se protežu kroz intercelularne tesne veze do gornjih slojeva *stratum corneum*-a (Clayton i sar., 2017; Kubo i sar., 2009) (Figura 3). Langerhansove ćelije su zadužene za „procenu opasnosti“ od antigena sa kojim se susreću. Ukoliko je antigen nepatogene prirode aktiviraju T regulatorne (T reg) limfocite, a ukoliko je u pitanju patogeni antigen, zajedno sa keratinocitima učestvuju u urođenom imunskom odgovoru, i iniciraju jačinu i specifičnost odgovora T limfocita (Clayton i sar., 2017). Funkcija ovih ćelija je pod uticajem medijatora iz keratinocita među kojima najvažniju ulogu ima Tumor nekrotični faktor- α (TNF- α). Langerhansove ćelije regulišu imunski odgovor kože. Eksprimiraju veliki broj MHC molekula II klase. Odlikuju se specifičnim strukturama – Birbekovim granulama i sadrže protein langerin. Preživljavanje Langerhansovih ćelija zavisi od koncentracije IL-34 poreklom iz keratinocita, i faktorom rasta povezanim sa onkogenom transformacijom ćelija (engl. *Transforming Growth Factor*- β – TGF- β).

Figura 3. Dendritske ćelije i njihovi nastavci koji dovode do proboja tesnih veza prilikom inflamacije.



(preuzeto iz De Benedetto i sar., 2011)

Melanociti takođe mogu imati imunsku funkciju. Kada su aktivirani, oni proizvode IL-1, IL-3 i IL-6, TNF- α i TGF- β , IL-8 i faktora hemotakse monocita (Salmon i sar., 1994).

U epidermisu se nalazi populacija rezidentnih memorijskih T limfocita koja je u kontaktu sa Langerhansovim ćelijama i proizvodi citokine koji pomažu proliferaciju keratinocita i zarastanje rana (Zhang i sar., 2022). Njihov broj je dvostruko veći od broja limfocita u cirkulaciji (Tokura i sar., 2021).

Ćelije dermisa koje imaju ulogu u imunskom sistemu kože: Antigen-prezentujuće ćelije dermisa se dele na dendritske ćelije i tkivne makrofage. Dugo se smatralo da sve antigen prezentujuće ćelije potiču od monocita. Međutim, danas je poznato da dendritske ćelije potiču od progenitora/prekursora dendritskih ćelija koji se nalaze u koštanoj srži i da ne prolaze kroz stadijum monocita, dok tkivni makrofagi vode poreklo iz žumančane kese ili nastaju od prekursora koji se formiraju u jetri fetusa. Interesatno je da tkivni makrofagi održavaju sopstvenu populaciju samoobnovom nezavisno od matičnih ćelija hematopoeze (Ginhoux i Jung, 2014; Schlitzer i sar., 2015). Tokom inflamacije, monociti se mogu transformisati u ćelije slične dendritskim ili tkivnim makrofagima (Kashem i sar., 2017). Dendritske ćelije dermisa se dele na one koje prezentuju virusne i „svoje“ antigene i na one koje su uglavnom odgovorne za aktivaciju Th2 limfocita tokom senzibilizacije proteinskim antigenima (Honda i sar., 2019). Posle fagocitoze antigena dendritske ćelije migriraju u regionalni limfni čvor i prezentuju antigen naivnim T limfocitima. Na membrani makrofaga se nalaze receptori za prepoznavanje molekularnih obrazaca patogena (engl. *Pattern Recognition Receptors* – PRR) koji detektuju oštećene molekule i molekulske obrasce patogena (Tay i sar., 2013). Po detekciji patogena, makrofagi se aktiviraju i produkuju citokine, hemokine, prostaglandine, leukotrijene i faktor aktivacije trombocita (Yanez i sar., 2017). Na taj način perpetuiraju imunsku reakciju.

Mastociti se nalaze blizu krvnih sudova dermisa. Iz koštane srži izlaze njihovi progenitori i diferenciraju se i sazrevaju lokalno u tkivu. Morfološki se karakterišu prisustvom brojnih citoplazmatskih granula koje sadrže: biogene amine (histamin i serotonin), proteaze (triptaze, himaze,

katapsin, granzim, karboksipeptidaze), lizozomalne enzime (glukuronidaza, heksozaminidaza, arilsulfataza), neke citokine (TNF, IL-4 i SCF) i proteoglikane kao što su heparin i hondroitin sulfat – koji prave anjonski gel u kome se skladište ovi medijatori (Moon i sar., 2014). Poseduju receptore visokog afiniteta za IgE (FcεRI) kao i PRR (Olivera i sar., 2018). Opisana su dva tipa degranulacije mastocita, prvi je ograničena degranulacija a drugi je anafilaktička degranulacija. Ograničena degranulacija podrazumeva selektivno oslobađanje pojedinih molekula, i dešava se kod hroničnog stresa, stimulacije TLR i interakcije sa T reg. Masovno oslobađanje sadržaja granula ili celih granula iz mastocita, posle fuzije granula ili fuzije granula sa membranom, je karakteristika anafilaktičke degranulacije, i dešava se po stimulaciji mastocita vezivanjem kompleksa antigen-IgE za FcεRI. Aktivirani mastociti oslobađaju i leukotrijene, prostaglandin D2 i faktor aktivacije trombocita odvojeno od granula, i učestvuju u procesima vazodilatacije, angiogeneze, eliminacije bakterija i parazita, regulišu funkciju dendritskih ćelija, makrofaga, T i B limfocita, fibroblasta, eozinofila, endotelnih ćelija i epitelnih ćelija (Krystal-Whittemore i sar., 2016; Moon i sar., 2014). Citokini Th2 limfocita: IL-3, IL-4, IL-9 i IL-10 podstiču proliferaciju mastocita (Nguyen i Soulika, 2019).

Neutrofili, eozinofili i bazofili su ćelije krvi koje mogu da migriraju u dermis ukoliko postoji odgovarajuće oštećenje tkiva, te se u fiziološkim uslovima nalaze u jako malom broju (Leiferman i Peters, 2018; Satoh, 2011; Wilgus i sar., 2013).

Limfociti koji učestvuju u imunskom sistemu kože su ćelije "prirodne ubice" (engl. *natural killer* – NK ćelije), B limfociti i T limfociti.

NK ćelije su limfociti koji ne eksprimiraju T ili B receptore. Učestvuju u urođenom i stečenom imunskom odgovoru. Proizvode granzim, perforin i granulizin i učestvuju u direktnoj destrukciji mikroorganizama i neoplastičnih ćelija. Imaju bitnu ulogu u patogenezi inflamatornih i infektivnih bolesti kože. Oslobađaju TNF-α, faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita (engl. Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor – GM-CSF) i IL-3, i promovišu aktivaciju makrofaga i fagocitozu (Quaresma, 2019).

B limfociti imaju centralnu ulogu u humoralnom imunskom odgovoru, prvenstveno zbog proizvodnje antitela kada se transformišu u plazmocyte, ali mogu imati i ulogu APC, i proizvoditi citokine. Ove ćelije mogu imati imunostimulatorni i/ili antiinflamatorni efekat (Quaresma, 2019). Do skora se nisu smatrali rezidentnim ćelijama kože, ali novija istraživanja pokazuju da imaju bitnu ulogu u očuvanju zdravlja kože (Debes i McGettigan, 2019). U zdravoj koži se transformišu u ćelije koje sekretuju IgM i IgA i vezuje komensale i mikroorganizme koji ulaze po proboju epidermalne barijere. IgM vezuje i pojačava uklanjanje ćelija podleglih apoptozi. Ove ćelije produkuju i IL-10 kako bi limitirale inflamaciju, kao i faktore rasta kako bi potpomogli zarastanje rana (Debes i McGettigan, 2019).

U dermisu se nalazi heterogena populacija Th limfocita koji učestvuju u klasičnom imunskom odgovoru, uključujući Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, Th25 i Treg (Quaresma, 2019). Dermis sadrži nekoliko puta veću populaciju T limfocita nego što se mogu naći u cirkulaciji, i to su uglavnom rezidentne ćelije pamćenja (Quaresma, 2019). Treg čine oko 10-30% kutane CD4+ ćelijske populacije u zdravoj ljudskoj koži i 20-60% u mišijoj (Zhang i sar., 2022). Najviše ih ima u dermisu, grupisanih oko kapilara, ali se mogu naći i u epidermisu i u subkutisu.

Tabela 1. Rezultati aktivacije različitih T pomoćničkih limfocita (T helper – Th) (Quaresma, 2019).

Tip ćelija	Signal za aktivaciju	Citokini koje sekretuju	Rezultat aktivacije
Th1	Infekcija intracelularnim organizmima IFN- γ i IL-12	IFN- γ i IL-2	Aktivacija makrofaga sa mikrobicidalnom aktivnošću
Th2	IL-4	IL-4 IL-5 IL-13 IL-31	Pomoć B ćelijama u sintezi Ig; uklanjanje ekstracelularnih parazita
Th3	TGF- β , IL-4 i IL-10	TGF- β , IL-4 i IL-10	Inhibitorno dejstvo na Th1 i Th2; preusmeravanje B limfocita na proizvodnju IgA
Th9	IL-4 i TGF- β	IL-4, IL-9, IL-10, IL-21 i TGF- β	Kontrola inflamatornog odgovora
Th17	IL-6, IL-1	IL-17 i IL-22	Prva linija odbrane kod gljivičnih i bakterijskih infekcija
Th22	TNF α i IL-6	IL-22	Zarastanje rana; pronalaze se u patološkim stanjima kože
Th25	IL-25	IL-4, IL-13, IL-25	Degranulacija mastocita
Treg	Nastanak ovih ćelija zavisi od TGF β a održavanje i aktivnost od IL-2	TNF β i IL-10	Inhibicija aktivacije B ćelija kao i diferencijacije i proliferacije NK ćelija

Disbalans imunskog sistema kože kod atopijskog dermatitisa

Jedan od važnih faktora u patogenezi hipersenzitivne reakcije I tipa je narušen balans između odgovora Th1 i Th2 limfocita. Naime, po kontaktu sa alergenom aktiviraju se Th2 limfociti koji luče IL-4, IL-5 i IL-13 (Romagnani, 1999). Ustanovljeno je da se kod pacijenata sa akutnim atopijskim dermatitisom nalazi viša koncentracija IL-4 i niža koncentracija INF γ , a IL-4 je ključni citokin za diferencijaciju naivnih T limfocita u Th2 limfocite, za stvaranje IgE antitela i hemotaksu eozinofila. Za razvoj, preživljavanje i proliferaciju eozinofila najvažniji je IL-5 koji se nalazi u višim koncentracijama u koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom i korelira sa koncentracijom IgE. IL-13 se nalazi u akutnim ali i u hroničnim lezijama kože kod atopijskog dermatitisa, indukuje ekspresiju IL-5, a time i infiltraciju eozinofilima. Po funkciji se njegovo dejstvo poklapa sa dejstvom IL-4 tako da sva istraživanja procenjuju zajedničke efekte ova dva medijatora. Novije studije su pokazale da T limfociti koji sekretuju IL-22 i IL-17 učestvuju u otpočinjanju i u održavanju ovog stanja (Brandt i Sivaprasad, 2011; David Boothe i sar., 2017). U humanojoj populaciji, akutni atopijski dermatitis se povezuje sa značajnim povećanjem ekspresije citokina Th2 i Th22 grupe, i manjim povećanjem IL-17, dok se kod hronične

faze bolesti pored značajnijeg povećanja Th2 i Th22 citokina primećuje i porast Th1 citokina (Gittler i sar., 2012). Ovaj preokret citokinskog profila podrazumeva da eozinofili i APC lokalno proizvode IL-12. IFN γ aktivira apoptozu keratinocita i time dovodi do stvaranja ekcematoznih lezija. IL-11 pozitivno utiče na remodelovanje kože i povećan je kod hroničnog atopijskog dermatitisa (Ong i Leung, 2006).

Skorašnjim istraživanjima je utvrđena značajna uloga IL-31 u patogenezi atopijskog dermatitisa, specijalno u pojavi pruritusa. IL-31 proizvode aktivirani Th2 limfociti, mastociti, dendritske ćelije i makrofagi a receptori za IL-31 se nalaze na keratinocitima, mastocitima, eozinofilima, bazofilima i neuronima (Saleem i sar., 2017). Pored njegove uloge vezane za nastanak pruritusa smatra se da negativno utiče na diferencijaciju keratinocita kao i na ekspresiju filagrina (Cornelissen i sar., 2012). Dendritske ćelije kože smatraju se najvažnijim za preusmeravanje T ćelijskog odgovora ka Th2 odgovoru. Aktivacija dendritskih ćelija je dovoljna da se pokrene Th2 odgovor, dok bazofili i eozinofili učestvuju ali nisu neophodni za odigravanje kompletnog Th2 odgovora (Hammad i sar., 2010). Ustanovljeno je da je u koži tokom inflamacije, kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom, dominantna populacija Langerhansovih ćelija, zamenjuje populacijom inflamatornih dendritskih epidermalnih ćelija (Novak, 2012).

Postojanje receptora za IgE je obeležje dendritskih ćelija kod atopijskog dermatitisa, i broj receptora se povećava sa težinom kliničke slike. Postoje i radovi koji ukazuju na to da se Langerhansove ćelije kod ove specifične patologije nalaze u višim slojevima epidermisa nego u zdravoj koži (Yoshida i sar., 2014). Mastociti su glavni efektori hipersenzitivne reakcije prvog tipa, i zajedno sa T limfocitima, smatraju se odgovornima za pojavu lezija kod atopijskog dermatitisa kod modela miša, a težina kliničke slike je u korelaciji sa brojem mastocita (Ando i sar., 2013).

2.1.2. Dijagnostika atopijskog dermatitisa

Dijagnoza atopijskog dermatitisa kod pasa se postavlja klinički, ukoliko pacijent ispunjava određene kriterijume i ako se isključe sve druge bolesti sa sličnom kliničkom slikom. Iako se najčešće javlja pruritus, ne postoji patognomonični znak bolesti, što je najverovatnije posledica različitih kliničkih prezentacija, koje mogu zavisiti od genetskih faktora (rasa psa), proširenosti lezija (lokalizovano ili generalizovano), stadijuma bolesti (akutno ili hronično) i prisustva sekundarnih infekcija. Neophodna je detaljna interpretacija istorije bolesti i kliničkih osobenosti, a za te svrhe postoje različite skale za procenu verovatnoće atopijskog dermatitisa kao što su Willems-ova, Prelaud-ova, i najnovija i najčešće korišćena Favrot-ova skala (Hensel i sar., 2015; Favrot i sar., 2010; Prélaud i sar., 1998; Willemse, 1988). Favrot-ova skala sadrži dva seta kriterijuma koji imaju različitu senzitivnost i specifičnost, i u zavisnosti od toga koji set se koristi i koliko kriterijuma pacijent ispunjava povećava se tačnost dijagnoze (Tabela 2). Prvi set kriterijuma se uglavnom koristi za kliničke studije, dok se drugi set koristi u kliničkoj praksi. Postavljanje definitivne dijagnoze atopijskog dermatitisa kod pasa je regulisano smernicama koje je doneo Internacionalni komitet za alergijske bolesti životinja (engl. *International Committee on Allergic Diseases of Animals - ICADA*) (Hensel i sar., 2015).

Tabela 2. Favrot-ovi setovi kriterijuma, sa osetljivošću i specifičnošću.

Set 1:	
1. Simptomi su se prvi put pojavili pre navršene tri godine života.	Pacijent zadovoljava 5 kriterijuma —Osetljivost 85.4% —Specifičnost 79.1%
2. Pas pretežno boravi u kućnim uslovima.	
3. Terpija kortikosteroidima pokazuje efekat na pruritus.	
4. Pojava hroničnih ili ponavljajućih gljivičnih infekcija.	
5. Zahvaćeni su prednji ekstremiteti.	Pacijent zadovoljava 6 kriterijuma —Osetljivost 58.2% —Specifičnost 88.5%
6. Zahvaćene su ušne školjke.	
7. Nisu zahvaćene margine uva.	
8. Nije zahvaćen dorzo-lumbalni predeo.	
Set 2:	
1. Simptomi su se prvi put pojavili pre navršene tri godine života.	Pacijent zadovoljava 5 kriterijuma —Osetljivost 77.2% —Specifičnost 83%
2. Pas pretežno boravi u kućnim uslovima.	
3. Prilikom prve pojave pruritusa nema lezija na koži	
4. Zahvaćeni su prednji ekstremiteti.	Pacijent zadovoljava 6 kriterijuma —Osetljivost 42% —Specifičnost 93.7%
5. Zahvaćene su ušne školjke.	
6. Nisu zahvaćene margine uva.	
7. Nije zahvaćen dorzo-lumbalni predeo.	

Procena ozbiljnosti kliničke slike se određuje na osnovu indeksa raširenosti i težine atopijskog dermatitisa kod pasa (*Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index - CADESI*). CADESI-4 podrazumeva ocenjivanje bodovima od 0–3 za jačinu eritema, lihenifikacije i ekzorijacije/alopecije, za svako od 20 predilekcionih mesta na telu gde može da se javi promena kod atopijskog dermatitisa. Što je veći zbir bodova to se klinička slika smatra ozbiljnijom (Olivry i sar., 2014). Ukoliko se dermatološkim dijagnostičkim postupcima u koje spadaju bris kože, trihogram, citološki pregled i skarifikat kože, kao i eliminacionom dijetom, ne pronađe razlog pruritusa i promena, i pacijent ispunjava navedeni set kriterijuma, postavlja se klinička dijagnoza atopijskog dermatitisa. Ukoliko su klinički znaci teški, pruritus traje više od 3 meseca godišnje i antipruritična terapija ne daje rezultate, a vlasnik je zainteresovan, pristupa se alergijskom testiranju, kako bi se definisali alergeni na koje je pas senzibilisan, i sproveda alergen specifična imunoterapija (Hensel i sar., 2015). Alergijska testiranja mogu biti serološka, kada se u serumu detektuju alergen specifična antitela (IgE) ili intradermalno testiranje, kada se procenjuje lokalna reakcija kože na intradermalno aplikovan antigen (Hensel i sar., 2015).

2.1.3. Terapija

Terapija nije univerzalna i mora se prilagoditi svakom pacijentu. Uvek se prvo terapijaju sekundarne infekcije. Potom je cilj suzbijanje pruritusa koje se postiže na različite načine:

- 1) Identifikacija i uklanjanje alergena koji izazivaju reakciju – u slučajevima kada je moguće sprečiti kontakt sa alergenom smatra se najboljom terapijom;
- 2) poboljšanje higijene i nege kože i dlačnog pokrivača – ustanovljeno je i da kupanje samo vodom može poboljšati kliničku sliku, kao i dodatak esencijalnih masnih kiselina u ishranu, ili topikalna primena lipidnih preparata u cilju poboljšanja funkcije kožne barijere; smanjivanje pruritusa topikalnim glukokortikoidima, sistemskim glukokortikoidima ili ciklosporinima;
- 3) sprovođenje strategija za prevenciju rekurentnih stanja – imunoterapija specifičnim alergenima (Olivry i sar., 2010);
- 4) bolje razumevanje patofizioloških mehanizama atopijskog dermatitisa, dovelo je do upotrebe inhibitora citokina/interleukina koji učestvuju u patogenezi bolesti.

Iako su atopijski dermatitis pasa i atopijski dermatitis ljudi slični jer se spontano javljaju u mlađem životnom dobu i imaju iste kliničke manifestacije, razlika je u tome da se kod ljudi često javlja tzv. „atopijski marš“ ili „atopijska trijada“, koja podrazumeva pojavu atopijskog dermatitisa sa kasnijom pojavom alergije na hranu, atopijskog rinitisa i atopijske astme, dok kod pasa oboljenje ostaje na nivou atopijskog dermatitisa (Arcique i Bajwa, 2020; Terada i sar., 2011). Kod ljudi, alergen se uglavnom unosi inhalacijom, dok se kod pasa pretežno „unositi“ preko kože (Marsella i De Benedetto, 2017).

2.2. Sistemska inflamacija

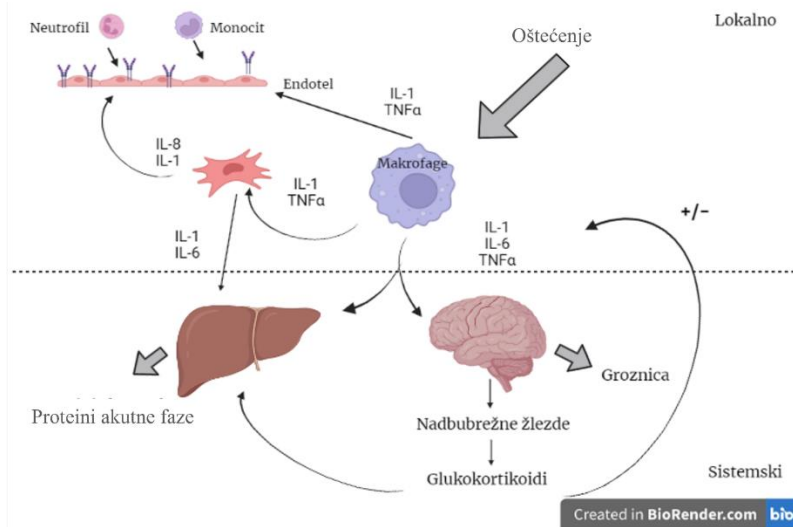
Sistemska inflamacija nastaje kada je stepen oštećenja tkiva takav da dovodi do stvaranja one koncentracije citokina koja može imati endokrino dejstvo i uticati na sve organe i organske sisteme orkestrirajući sveobuhvatnu odbrambenu reakciju.

U organizmu, kao posledica delovanja najraznovrsnijih bioloških agenasa, hemijskih i fizičkih faktora ili imunskih reakcija dolazi do oštećenja tkiva koje dalje inicira splet reakcija imunskog, endokrinog i nervnog sistema i promene u metabolizmu sa ciljem da se ukloni štetni agens i oštećene ćelije, ali i da se obezbede uslovi za regeneraciju i reparaciju tkiva. Nespecifične promene koje nastaju u prvih nekoliko dana po oštećenju tkiva se nazivaju reakcija akutne faze. Odgovor akutne faze započinje odmah po oštećenju tkiva i dostiže kulminaciju za 24-72h, sa ciljem da se povrati homeostaza organizma. Međutim, ukoliko se ne ukloni početni stimulus, ili ukoliko regulatorni mehanizmi ne obavljaju svoju funkciju, proces može postati hroničan (Liu i Ahearn, 2005).

Ćelije koje su pokretači odgovora akutne faze su tkivni makrofagi ili monociti iz krvi. Makrofagi oslobađaju široki spektar medijatora, kao što su IL-1, IL-6 i TNF α , koji dodatno stimulišu proizvodnju IL-6 u oštećenom tkivu (Koj, 1996; Liu i Ahearn, 2005). Ovi rani „alarmni“ citokini imaju pleotropno dejstvo i deluju lokalno i sistemski. Na mestu oštećenja aktiviraju se i stromalne ćelije uključujući fibroblaste i endotelne ćelije, i prouzrokuju oslobađanje drugog talasa citokina. Endotelne ćelije na ove citokine reaguju eksprimiranjem adhezivnih molekula i tako omogućavaju adherenciju i dijapezezu leukocita iz krvi u oštećeno tkivo (Baumann i Gauldie, 1994). Sistemski najizraženiji efekti IL-1 i IL-6 su na nivou nervnog tkiva i jetre. Naime, u mozgu se prostaglandin E2 vezuje za receptore za termoregulaciju na anteriornom hipotalamusu i izaziva groznicu (Dinarello i sar., 1991). Dešavanja

u tkivu jetre imaju centralnu ulogu u odgovoru akutne faze, i uključuju promene u metabolizmu proteina koji se nazivaju proteini akutne faze.

Šema 1. Pokretanje lokalne i sistemske reakcije akutne faze pod dejstvom brojnih proinflamatornih medijatora.



Preuzeto i modifikovano od Liu i Ahearn, 2005.

2.2.1 Reaktanti akutne faze

Reakcija akutne faze dovodi do promena u koncentraciji mnogih molekula koji pripadaju proteinima, lipidima i ugljenim hidratima, ali to mogu biti i pojedinačne aminokiseline, joni metala i brojni metaboliti (Cray i sar., 2009; Liu i Ahearn, 2005).

Citokini su mali molekuli koji obezbeđuju komunikaciju među ćelijama. Podrazumevaju limfokine, monokine, hemokine i interleukine. Imaju autokrinu, parakrinu i endokrinu funkciju (Zhang i An, 2007). Citokini se mogu podeliti u tri grupe: proinflamatorni: 1) $TNF-\alpha$, IL-1, $IFN-\gamma$ i IL-8; 2) citokini tipa IL-6, koji su odgovorni za glavne sistemske efekte odgovora akutne faze: u ovu grupu citokina spada i IL-11; 3) antiinflamatorni citokini koji suprimiraju odgovor akutne faze: IL-4, IL-10, IL-13 i $TGF-\beta$. Ipak, ovo je pojednostavljena podela, jer se isti citokini ponašaju drugačije u zavisnosti od stadijuma inflamacije, i imaju mnoga imunomodulatorna dejstva (Koj, 1996).

Proteini čija se koncentracija tokom odgovora akutne faze menja, za najmanje 25% od početne koncentracije, nazivaju se proteinima akutne faze (engl. *Acute phase proteins* – APP), i grupišu se u pozitivne i negativne, u zavisnosti od toga da li im koncentracije raste ili opada (Liu i Ahearn, 2005). Pozitivni proteini se dalje klasifikuju u glavne, umerene i minorne proteine u zavisnosti od srazmere porasta koncentracije. Glavni proteini predstavljaju one čija koncentracija raste od 10-100 puta, umereni proteini beleže porast tokom akutne faze 2-10 puta i minorni proteini su oni koji za manje od 2 puta povećavaju svoju koncentraciju (Cray i sar., 2009). Većina pozitivnih proteina akutne faze se sintetiše u jetri pod dejstvom citokina tipa IL-1, citokina tipa IL-6, faktora rasta i glukokortikoida.

Citokini tipa IL-1 podstiču proizvodnju APP tipa 1, kao što su SAA, proteini komplekta i haptoglobin, dok citokini tipa IL-6 indukuju stvaranje proteina akutne faze tipa 2, a to su C- reaktivni protein (CRP) i fibrinogen. Faktori rasta i glukokortikoidi uglavnom imaju imunomodulatorno dejstvo. Tako na primer TGF- β ima inhibitorno dejstvo na APP tipa 1, ali stimulatorno na APP tipa 2 (Liu i Ahearn, 2005). Značajan rast glavnih APP se uočava u prvih 6h posle dejstva početnog oštećenja i uglavnom isto tako brzo njihova koncentracija opada, usled veoma kratkog poluživota. Umereni i slabi proteini akutne faze uglavnom postižu više koncentracije polako i mogu značajno duže ostati u cirkulaciji, u zavisnosti od inicijalnog faktora. Umereni i slabi APP češće se uočavaju tokom hronične inflamacije. Kod pasa glavni proteini akutne faze su CRP i SAA (Cray i sar., 2009). Tokom hronične inflamacije njihova koncentracija je takođe povećana, ali ne u onoj meri kao kod akutne. Takođe, porast koncentracije APP je u srazmeri sa obimom oštećenja tkiva. Interesantna je mogućnost da zapravo porast pojedinih APP nije istovetan kod svih oštećenja, jer bi se na taj način izdvojili oni APP koji bi bili od dijagnostičkog značaja za pojedina patološka stanja.

- CRP – β -globulin je prvi otkriveni protein akutne faze. Naziv je dobio zahvaljujući svojoj sposobnosti vezivanja za tzv. polisaharid C *Streptococcus pneumoniae*. U fiziološkim uslovima koncentracija ovog proteina je veoma niska, ali ima mogućnost da se izrazito poveća na samom početku inflamacije. Ima ulogu opsonina tako što vezuje polisaharide na bakterijama, gljivicama i parazitima, kako bi aktivirao C1 komponentu komplekta a posledično i fagocitozu. CRP može da podstakne ili inhibira produkciju citokina i hemotaksu. Kod veoma blagih inflamacija njegova koncentracija raste, te ovaj protein može biti jedini indikator postojanja inflamatornog procesa u organizmu (Božić, 2012; Liu i Ahearn, 2005).

- SAA je α 1-globulin čiji se aminokiselinski sastav tokom evolucije očuvao što govori o njegovom značaju u nespecifičnoj odbrani organizma. U cirkulaciji se nalazi vezan za HDL čestice. Izaziva hemotaksu monocita, polimorfonukleara i T ćelija. Takođe suprimira inflamatorni proces. Kod pasa pokazuje čak viši raspon izmerenih vrednosti kod sistemske inflamacije nego CRP, što bi moglo da ukaže na bolji dijagnostički kapacitet SAA kod pasa (Božić, 2012; Christensen i sar., 2014). Ukoliko se razmatra povezanost SAA i metabolizma lipida, postoje naznake da je ovaj apoprotein važan za reutilizaciju holesterola prilikom inflamatornih procesa (Kisilevsky i sar., 2012)

Haptoglobin, ceruloplazmin i α 1 kiseli glikoprotein su kod pasa svrstani u grupu umerenih proteina akutne faze.

- Haptoglobin – α 2-globulin smanjuje oksidativno oštećenje izazavano hemolizom, tako što vezuje slobodni hemoglobin, a takođe je ustanovljeno da ima bakteriostatski i imunomodulatorni efekat (Cray i sar., 2009).

- α 1-kiseli glikoprotein – vezuje lipopolisaharide i inhibira njihovu aktivnost, a može prenositi i lekove i održavati transport u stanjima kada je nivo albumina niži. Takođe suprimira neutrofile i komplement, i sprečava agregaciju trombocita (Cray i sar., 2009).

- Ceruloplazmin – ovaj protein je spororeagujući APP, pripada grupi α 2-globulina. Neophodan je za održavanje homeostaze bakra i gvožđa. Antiinflamatorni je molekul i inhibira reakciju stvaranja superoksidnih radikala, što mu daje dominantan značaj u antioksidativnoj zaštiti lipida u membranama ćelija (Cray i sar., 2009). Antioksidativna uloga se ogleda u tome što oksidiše dvovalentni molekul gvožđa u trovalentni oblik, koga onda vezuje transferin, a u toj reakciji se kiseonik redukuje do vode (Satyanarayana i sar., 2021). Postoje indicije da bi ceruloplazmin bio dobar marker slabe hronične inflamacije (Shaikh Mohiuddin i Manjrekar, 2018).

Pozitivni APP imaju mnogobrojne uloge budući da utiču na funkcije imunskog sistema, učestvuju u odgovarajućoj lokalizaciji proteina transport proteina i te sprečavaju prekomerno inflamatorno tkivno oštećenje (Cray i sar., 2009).

Albumin predstavlja negativni APP. Njegova smanjena koncentracija može biti posledica smanjene sinteze u jetri ili gubitka putem eksudacije. Pretpostavlja se da se aminokiseline preusmeravaju na proizvodnju u tom trenutku bitnijih, pozitivnih APP i drugih medijatora inflamacije, te se sinteza albumina smanjuje.

Transferin je takođe negativan APP. To je glikoprotein plazme odgovoran za transport gvožđa. Uglavnom se njegova koncentracija određuje merenjem totalnog kapaciteta seruma za vezivanje gvožđa (engl. *Total Iron-Binding Capacity* – TIBC).

Mnogi drugi proteini i molekuli, čija se koncentracija smanjuje tokom odgovora akutne faze zbog preusmeravanja gradivnih elemenata na stvaranje pozitivnih APP i medijatora inflamacije, mogu se smatrati negativnim reaktantima akutne faze (Cray i sar., 2009).

Gvožđe spada u negativne reaktante akutne faze. Interesantno je da je u koži pacijenata sa atopijskim dermatitisom nađena duplo veća koncentracija gvožđa nego kod zdravih kontrola (Leveque i sar., 2003). S druge strane, koncentracija gvožđa u serumu je bila ista kod dece sa atopijskim dermatitisom i zdravih kontrola (Toyran i sar., 2012).

Paraoksonaza 1 (PON1) se sintetiše u jetri i cirkuliše vezana za HDL čestice, udružena sa apolipoproteinom A1. Prirodni supstrati ovog enzima su mnogobrojni. Uloga PON1 je, između ostalog i hidroliza lipidnih peroksida i homocistein tiolaktona — tioestar homocisteina koji dalje reaguje sa lizinom u proteinima i denaturiše ih (Mackness i sar., 1998; Litvinov i sar., 2012; Torun i sar., 2014). Koncentracija PON1 pada tokom inflamacije, što je svrstava u negativne reaktante akutne faze (Kulka, 2016).

2.2.1.1. Reakcija akutne faze tokom atopijskog dermatitisa

Poznato je da kod atopijskog dermatitisa postoji lokalna inflamacija kože, ali nisu poznate razmere sistemskog efekta ovog oboljenja. Moglo bi se očekivati da sistemske promene postoje jer je koža najveći organ koji čini oko 15% mase tela kod ljudi. Kod štenaca je to 26% mase, a kod odraslih pasa 12% (Scott, 2001). Takođe, kao što je prethodno navedeno, različiti slojevi kože sadrže veliki broj imunskih ćelija koje kada se aktiviraju luče proinflamatorne citokine koji eventualno mogu imati i sistemsko dejstvo.

Poznato je da osobe sa atopijskim dermatitisom imaju veći rizik od razvoja kardiovaskularnih, bubrežnih i autoimunskih bolesti, metaboličkog sindroma i psihijatrijskih komorbiditeta, ali direktna veza još uvek nije pronađena (Darlenki i sar., 2014; Oliveira i Torres, 2019). U serumu pacijenata sa atopijskim dermatitisom mogu se naći više koncentracije CRP-a nego kod zdravih osoba a njegova koncentracija korelira sa težinom bolesti (Mohamed i sar., 2021; Vekaria i sar., 2017). Istraživanja SAA kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom su dala različite rezultate. Kod onih koji su na topikalnoj terapiji kortikosteroidima ustanovljene su niže koncentracije SAA nego kod pacijenata koji nisu na terapiji, a postojala je i pozitivna korelacija ovog proteina i eozinofila, ali nije ustanovljena razlika u koncentraciji SAA između zdravih i obolelih jedinki (Suzuki i sar., 2018). Upoređivanjem koncentracije SAA između pacijenata sa atopijskim dermatitisom koji imaju povišen IgE i onih koji nemaju, utvrđeno je da se kod pacijenata sa višom koncentracijom IgE mogu izmeriti i više

koncentracije SAA, kao i da postoji korelacija između SAA i eozinofila, IgE i SCORAD (SCORingAtopicDermatitis) indeksa (Khattab i Ibraheem, 2022). Ceruloplazmin je niži kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom nego kod zdravih kontrola, ali se pretpostavlja da je taj pad povezan sa njegovom ulogom u antioksidativnoj zaštiti organizma (Bae i Kim, 2022). U pilot studijama nije ustanovljena razlika u koncentraciji CRP-a, haptoglobina i albumina između pasa sa atopijskim dermatitisom i zdravih kontrola, iako je ustanovljena blaga korelacija između koncentracije CRP-a i CADESI skora (Favrot i sar., 2021; Ramon i Anson, 2015). Na osnovu svih navedenih podataka može se zaključiti da još uvek nije definisano da li je atopijski dermatitis praćen sistemskom inflamacijom.

Kod pasa su pronađene niže koncentracije PON1, vitamina E i MDA, ali bez razlike u SOD i GPx, u odnosu na zdrave kontrole (Almela i sar., 2018; Kapun i sar., 2012; Plevnik Kapun i sar., 2013).

2.2.2. Lipidni metabolizam i dislipidemija tokom inflamacije

Lipidni metabolizam podrazumeva sintezu strukturnih i funkcionalnih lipida, kao što su fosfolipidi, glikolipidi, sfingolipidi, holesterol i prostaglandini koji su karaktetistični za pojedina tkiva, i razgradnju lipida, kako bi se zadovoljile metaboličke, odnosno energetske potrebe organizma (Gyamfi i sar., 2019).

Lipidi su nerastvorljive organske komponente, koje su esencijalne za funkcionisanje živog sveta: gradivni su elementi ćelijske membrane, energetski su bogati molekuli, kofaktori su enzima, važni su za sintezu steroidnih hormona i predstavljaju unutarćelijske signalne molekule. Masne kiseline su prosti lipidi i važne komponente drugih lipida. Holesterol je osnovni sterol u životinjskim tkivima, uglavnom se unosi hranom ali ga mogu stvarati sve ćelije u organizmu. Metaboliše se u žučne kiseline, a prekursor je steroidnih hormona i vitamina D. Trigliceridi su najčešći i najefikasniji oblik skladištenja energije. Mogu se uneti hranom ili endogeno sintetisati. Kako su lipidi u vodi nerastvorljivi molekuli, kroz plazmu se transportuju kao kompleks lipoproteinskih čestica. Lipoproteini su čestice okruglog oblika, izgrađene od hidrofobne srži u kojoj se nalaze trigliceridi i estri holesterola i amfolitnog omotača koji se sastoji od fosfolipida, slobodnog holesterola i proteina (Gyamfi i sar., 2019). Lipoproteini plazme se razlikuju po svojim fizičkim i hemijskim karakteristikama kao što su veličina, gustina i sastav. Proteini koji učestvuju u formaciji lipoproteina nazivaju se apolipoproteinima i značajni su jer regulišu njihovu metaboličku funkciju, pomažu lipidni transport, održavaju strukturni integritet i aktivaciju određenih enzima koji igraju ključnu ulogu u lipidnom metabolizmu.

Lipoproteini se prema sastavu i funkciji mogu podeliti na 5 osnovnih klasa: hilomikroni, lipoproteini veoma male gustine (engl. *very low-density lipoproteins* – VLDL), lipoproteini intermedijarne gustine (engl. *intermediate-density lipoproteins* – IDL), LDL i HDL. Kod pasa ne postoji klasa IDL. HDL može biti podeljen na HDL1 (koji je jedinstven za pse), HDL2 i HDL3 (Bergen i Mersmann, 2005). Lipoproteini mogu sadržati jedan ili više različitih apolipoproteina.

Hilomikroni se formiraju u enterocitima od lokalno sintetisanih triglicerida, fosfolipida, slobodnog i esterifikovanog holesterola i apolipoproteina B48. Oni se sintetišu od resorbovanih masnih kiselina i resorbovanog holesterola. Njihova funkcija je transport lipida putem limfotoka, a kasnije i putem krvi, do svih tkiva, osim jetre. Do jetre stižu u obliku ostataka hilomikrona. U krvi preuzimaju apolipoprotein C i E od HDL čestica. Lipoprotein lipaza je enzim koji se nalazi na luminalnoj površini kapilarnog endotela i hidrolizuje trigliceride u lipoproteinima do slobodnih masnih kiselina, mono- i diglicerida i glicerola, a kofaktor ovog enzima je ApoC-II, koji je eksprimiran na površini hilomikrona. Ostaci hilomikrona su čestice bogate holesterolom koje prebacuju ApoC-II molekule HDL česticama.

Potom se ostaci hilomikrona vezuju za receptore na hepatocitima koji ih brzo uklanjaju iz cirkulacije endocitozom. Dok su hilomikroni odgovorni za transport lipida resorbovanih iz creva, VLDL, LDL i HDL su uglavnom uključeni u metabolizam endogeno nastalih lipida. Trigliceridi sintetisani u jetri i holesterol se kombinuju sa fosfolipidima i ApoB100 i ApoE i nastaje VLDL čestica, čija je uloga transport sintetisanih triglicerida do drugih tkiva. Ostaci VLDL-a se ili uklanjaju iz cirkulacije u jetri ili ih dalje transformiše lipoprotein lipaza i/ili hepatična lipaza kako bi formirali LDL. LDL uglavnom sadrži holesterol estre i fosfolipide, cirkuliše u krvi i vezuje se za specifične receptore koji su distribuirani kroz tkiva kako bi dostavio holesterol ćelijama, koji može biti upotrebljen za sintezu steroidnih hormona ili ćelijskih membrana kao i za metabolizam u hepatocitima. HDL se sintetiše primarno u jetri. Najbitniji gradivni i funkcionalni protein, koji određuje veličinu i oblik HDL čestice je apolipoprotein A1 (ApoA1). HDL ima značajnu ulogu kao donator i akceptor apolipoproteina C, apo E i raznih lipida od drugih lipoproteina u cirkulaciji. Ima kritičnu ulogu u reverznom transportu holesterola, koji omogućava da se holesterol iz perifernih tkiva transportuje do jetre. HDL holesterol se esterifikuje aktivacijom lecitin-holesterol acil transferaze (LCAT), sa ApoA1 kao kofaktorom, i nastali holesterol estri se pomeraju u srž HDL čestice, omogućavajući da se još slobodnog holesterola veže na površinu čestice. Vezivanje slobodnog holesterola i esterifikacija LCAT-om dovodi do formiranja veće, holesterol estrom bogate, HDL2 čestice. Ovaj enzim igra i značajnu ulogu u reverznom transportu holesterola. Kod ljudi je dodatni enzim holesterol ester transfer protein (CETP) uključen u lipidni metabolizam, i njegova funkcija je transfer triglicerida sa VLDL-a i hilomikrona u HDL2, i holesterol estara sa HDL2 na VLDL i LDL. Aktivnost ovog enzima nije pokazana kod pasa, što za rezultat ima velike HDL1 i HDL2 čestice koje nose dosta molekula holesterol estara (Bergen i Mersmann, 2005). HDL1 transportuje holesterol estre iz tkiva do jetre za uklanjanje ili ponovnu upotrebu, a ne na LDL ili VLDL čestice kao što je slučaj kod ljudi, koji prebacuju holesterol estre na periferna tkiva. Upravo zbog svih navedenih karakteristika lipoproteina pasa, oni nemaju predispoziciju za nastanak ateroskleroze (Xenoulis i Steiner, 2010)..

Tokom inflamacije dolazi do promena u lipidnom metabolizmu koje bi trebalo da omoguće povoljan ishod akutne inflamacije po oštećenju tkiva. Vrlo često, one promene koje su u akutnom toku imale pozitivan efekat na organizam, u hroničnom toku mogu biti štetne za organizam. Trigliceridi plazme rastu zbog pojačane sekrecije VLDL kao posledice lipolize masnog tkiva, pojačane de novo sinteze masnih kiselina u jetri i supresije oksidacije masnih kiselina. Kod težih inflamacija VLDL klirens se smanjuje kao posledica smanjene aktivnosti lipoprotein lipaze i smanjenog udela apolipoproteina E u VLDL-u. Značajne promene koncentracije proteina važnih za HDL metabolizam dovode do smanjenog reverznog transporta holesterola i pojačanog dostavljanja holesterola imunskim ćelijama. Oksidacija LDL-a i VLDL-a se pojačava, i HDL postaje proinflamatorni molekul. Lipoproteini postaju bogati ceramidom, glukozilceramidom i sfingomijelinom, i makrofagi pojačavaju njihovu fagocitozu (Khovidhunkit i sar., 2004). Koncentracija SAA se povećava u HDL česticama koje postaju gušće i veće, i imaju manju količinu ApoA1, holesterola, triglicerida i fosfolipida. Pada količina HDL-a i nastaje ApoA1 iz cirkulacije (Cabana i sar., 1989). Kod životinja ApoA1 se ponaša kao negativni protein akutne faze, i pokazano je da se smanjuje njegova koncentracija tokom inflamacije kod svinja, i sepse kod pasa (Carpintero i sar., 2005; Giunti i sar., 2020). Naša prethodna istraživanja su pokazala da kod pasa inficiranih sa protozom *Babesia canis*, pored porasta proteina akutne faze ipak ne dolazi do pada, nego do porasta koncentracije ApoA1 (Milanović i sar., 2019).

2.2.2.1. Lipidni profil atopijskog dermatitisa

Brojna istraživanja ukazuju na postojanje izmenjenog lipidnog metabolizma kože (Bhattacharya i sar., 2019; Chermprapai i sar., 2018; Danso i sar., 2017; Franco i sar., 2021; Janssens i sar., 2012; Popa i sar., 2012) Ipak još uvek nije jasno da li postoji i poremećaj metabolizma lipida koji je sistemskog karaktera.

Kod dece sa atopijskim dermatitisom je viša koncentracija ukupnog holesterola i triglicerida, a postoji i pozitivna korelacija između ovih lipida i SCORAD-a. Ipak, koncentracija HDL holesterola je niža kod pacijenata koji boluju od atopijskog dermatitisa u odnosu na zdravu decu (Agón-Banzo i sar., 2020; Baek i sar., 2020; Kim i sar., 2020). Viša koncentracija LDL holesterola kod adolescenata sa atopijskim dermatitisom, kao i korelacija koncentracije IgE sa ukupnim holesterolom i LDL česticama kod školske dece ukazuju da kod pacijenata postoji sistemska dislipidemija iako nije jasno da li je ona primarni poremećaj ili je posledica eventualne supkliničke inflamacije (Kusunoki i sar., 2010; Leigh i sar., 2021). Kod odraslih ljudi sa ovim alergijskim oboljenjem, HDL čestice sadrže više koncentracije ApoA-II i SAA, a nižu apoC-II i apoE nego kod zdravih osoba, što sugeriše da je prisutna inflamacija (Trieb i sar., 2019).

2.2.3. Sistemska inflamacija kod srčane dirofilarioze, babezioze i piometre

Dirofilarioza je oboljenje pasa koje izaziva *Dirofilaria immitis* parazit iz roda Nematoda. Vektor ove parazitske nematode je komarac. Prisustvo odraslih parazita u desnoj komori i plućnim arterijama, i mikrofilarija u cirkulaciji oštećuje krvne sudove pluća i drugih organa (McCall i sar., 2008). *D. immitis* prvih nekoliko godina, u asimptomatskoj fazi infekcije, uglavnom izaziva hroničnu inflamaciju. Psi pozitivni na *Dirofilaria immitis* imaju više koncentracije CRP-a i niže koncentracije PON1 i albumina u odnosu na zdrave jedinke, ali nije prijavljena veća koncentracija SAA (Méndez i sar., 2014; Milanović i sar., 2017).

Babezioza je oboljenje pasa koje na našim prostorima najčešće izaziva intraeritrocitna protozoa *Babesia canis*. Krpelj *Dermacentor reticulatus* je vektor koji prenosi *B. canis*. Ovo oboljenje uglavnom ima izraženu akutnu kliničku sliku, sa izrazitim promenama proteina akutne faze. Kod ovog oboljenja je zabeležen značajan porast glavnih proteina akutne faze (CRP, SAA) ali i pad haptoglobina, kao posledica hemolize izazvane parazitom (Matijatko i sar., 2007; Ulutas i sar., 2005). U zavisnosti od sezone odgovor akutne faze može biti blaži ili jači (Janjić i sar., 2022). Takođe je pokazano da ovaj parazit može izazvati sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome* — SIRS), (Beletić i sar., 2021), ali i da asimptomatska infekcija izaziva supkliničku inflamaciju (Milanović i sar., 2020).

Piometra je stanje koje nastaje kod nesterilisanih kuja koje imaju poremećaj u odnosu estrogena i progesterona te su prediponirane na bakterijsku infekciju i inflamaciju endometrijuma. Kuje koje su razvile piometru u 60% slučajeva razvijaju SIRS, koji predstavlja preterano jak odgovor akutne faze i karakteriše se značajnim porastom glavnih i padom negativnih APP (Ahn i sar., 2021).

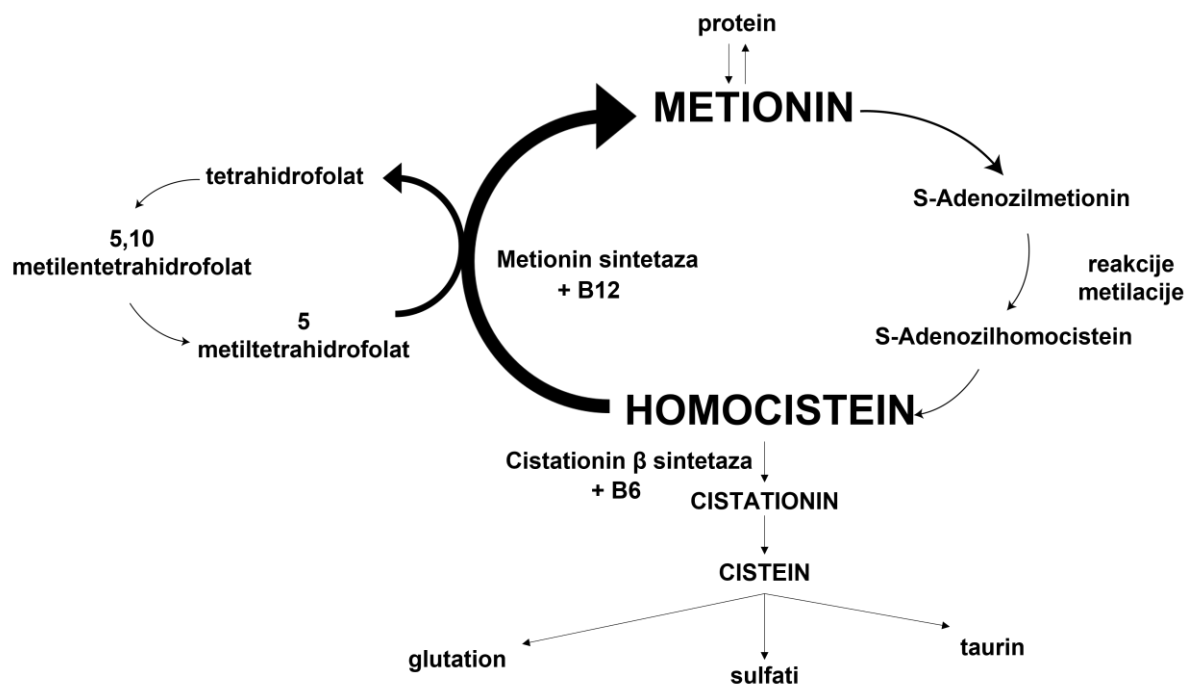
Pokazano je da je infestacija sa nematodom *Dirofilaria immitis* karakteriše blagom inflamacijom (Milanović i sar., 2017), koja ima hroničan tok, s obzirom na to da oboljenje može dugo da traje pre pojave prvih znakova bolesti. Psi sa babeziozom najčešće razvijaju akutnu inflamaciju umerenog intenziteta (Beletić i sar., 2021), dok je piometra jaka akutna inflamacija kod koje se često

pojavljuje SIRS (Ahn i sar., 2021). Ova oboljenja predstavljaju odlične modele za ispitivanje odgovora akutne faze različitog intenziteta.

2.3. Homocistein

Du Vigneard je 1932 ustanovio da delujući sumpornom kiselinom na metionin dobija novu aminokiselinu koja je slične strukture cisteinu ali sadrži jedan ugljenikov atom više i nazvao je homocistein (Butz i du Vigneaud, 1932). Homocistein potiče od metionina, naime, metionin aktiviran ATP-om pretvara se u S-adenozilmetionin (SAM) univerzalni donor metil grupe. Kada SAM donira metil grupu ostaje S-adenozilhomocistein (SAH). SAH se reverzibilno hidrolizuje i nastaje homocistein. Metabolizam Hcy može da ide u dva pravca: prvi — remetilacija, vitamin B12 zavisni put, kada homocistein dobija metil grupu od N-5-metiltetrahidrofolat-a uz pomoć vitamina B12, ili vitamin B12 nezavisni put, koji se odvija samo u jetri, kada takođe homocistein dobija metil grupu od N-5-metiltetrahidrofolata, ali uz pomoć betaina. Drugi pravac je transulfuracija. U ovom ireverzibilnom procesu cistation- β -sintetaza (CBS) sa koenzimom, vitaminom B6, spaja homocistein i serin i nastaje cistation. Cistation se hidrolizuje γ -cistationazom, opet uz vitamin B6 kao koenzim, i formira se cistein i α -ketobutirat. Višak cisteina se oksidiše do taurina ili neorganskih sulfata, ili izlučuje urinom, tako da se putem transulfuracije organizam oslobađa viška homocisteina (Selhub, 1999) (Shema 2.).

Šema 2. Metabolički putevi homocisteina



Preuzeto i modifikovano od Troen i sar., 2005.

Hiperhomocisteinemija može da nastane usled poremećaja aktivnosti ili nedostatka nekog od mnogobrojnih enzima koji učestvuju u procesima transmetilacije i transsulfuracije.

- Poremećena sinteza N-5-metiltetrahidrofolata

Narušena sinteza ovog jedinjenja za posledicu ima smanjenu remetilaciju homocisteina. Razlog može biti ili smanjena količina folata u organizmu ili mutacija na metiltetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) genu. Put transsulfuracije ne može da prevede sav višak homocisteina u cistein, a nedostatak SAM dodatno suprimira produkciju cistationa, pošto je SAM alosterni regulator CBS-a (Selhub, 1999).

- Poremećen proces remetilacije homocisteina

Nedostatak vitamina B12 ili defekt bilo kog enzima koji učestvuje u remetilaciji takođe utiču na pojavu hiperhomocisteinemije ali manjeg obima nego kada je u pitanju nedostatak N-5-metiltetrahidrofolat-a. Smatra se da je to zbog činjenice da se N-5-metiltetrahidrofolat akumulira kada je narušen proces remetilacije, i inhibira potrošnju SAM-a u metilaciji glicina. Tako da će manje homocisteina nastajati od SAM i postoji umerena aktivacija CBS-a (Selhub, 1999).

- Poremećen proces transsulfuracije homocisteina

Kada je proces transsulfuracije narušen, sav homocistein ulazi u put remetilacije i posledično raste koncentracija SAM-a. Kada SAM postigne određenu koncentraciju inhibira MTHFR i zaustavlja se i proces remetilacije. Time dolazi do nakupljanja homocisteina i jake hiperhomocisteinemije. Ukoliko je narušen proces transsulfuracije samo u manjoj meri, onda će hiperhomocisteinemija postati evidentna tek po opterećenju organizma metioninom (Selhub, 1999).

Istraživanja o homocisteinu su počela detekcijom homocistinurije kod pacijenata sa urođenim defektom metabolizma, za koji se kasnije ispostavilo da je nedostatak enzima cistation β -sintetaze. Homocistinuriju prati mentalna retardacija, te su istraživanja dalje ispitivala uloge homocisteina u poremećajima nervnog sistema. Istraživači su tek 70-ih godina prošlog veka počeli da povezuju hiperhomocisteinemiju sa trombovaskularnim poremećajima (Finkelstein i Martin, 2000).

2.3.1. Homocistein i sistemska inflamacija

Navodi iz literature sugerišu da se kod inflamatornih stanja javlja porast homocisteina u humanoj populaciji. Prvo objašnjenje za ovu pojavu je deficit vitamina, pre svega B6, B12 i folata koji se javlja prilikom inflamacije. Ovi vitamini su potrebni za proliferaciju, maturaciju i aktivnost limfocita i endogenu sintezu aminokiselina, za produkciju citokina i antitela. Kako se tokom inflamacije povećava aktivnost ćelija imuniteta povećava se i potreba za ovim vitaminima, što za sobom povlači smanjenje koncentracije navedenih vitamina (Gombart i sar., 2020; Ueland i sar., 2016). Deficit navedenih vitamina rezultira hiperhomocisteinemijom, te se tako hiperhomocisteinemija može smatrati pokazateljem inflamacije. Drugo objašnjenje uključuje povećanu proizvodnju NO tokom inflamacije. NO oksidiše vitamin B12 iz monovalentne u divalentnu formu i onemogućava prenos metil grupe, tj remetilaciju homocisteina, te time povećava koncentraciju homocisteina (Nunn, 1987). Hiperhomocisteinemija je pokazana kod različitih inflamatornih oboljenja kao što su reumatoidni artritis, inflamatorno oboljenje creva ali i psorijaza (Głuszek i sar., 2020; Lin i sar., 2019; Romagnuolo i sar., 2001). Hiperhomocisteinemija je uobičajen nalaz kod kardiovaskularnih bolesti, hronične bolesti bubrega, i neoplazija (Almadori i sar., 2002; Beletić i sar., 2009; Ganguly i Alam, 2015; Long i Nie,

2016; Radovanović i sar., 2010). Sva navedena oboljenja poseduju i komponentu inflamacije (Wu, 2007). Blaga hiperhomocisteinemija se javlja kod osoba koje puše ili su izložene zagađivačima iz vazduha, što je u skladu sa činjenicom da je kod tih pacijenata prisutna hronična subkličička inflamacija. Takođe, gojaznost, poznato hronično inflamatorno stanje prati blaga hiperhomocisteinemija (Wu, 2007). Porast koncentracije homocisteina se dugo smatrao faktorom rizika za razvoj koronarnih, cerebralnih i perifernih vaskularnih bolesti, zato što pojačava akutnu i hroničnu inflamaciju preko endotelijalne disfunkcije, adhezije leukocita i oksidativnog stresa, ali se postavlja pitanje šta je primarni uzrok povećanja koncentracije (Wu, 2007). Kod ljudi je primećen porast homocisteina kod septičnih pacijenata i povezan je sa lošijim ishodom (Ploder i sar., 2010), dok je kod pasa ustanovljen pad homocisteina kod pacijenata sa SIRS-om u odnosu na zdrave kontrole (Patterson i sar., 2013).

Hiperhomocisteinemija se navodi kao razlog pojačanog oksidativnog stresa, zato što homocistein formira disulfidne veze, i proizvodi slobodne kiseonikove radikale, ali postoje i tvrdnje da homocistein može imati i antioksidativno dejstvo (Liu i sar., 2013; Zappacosta i sar., 2000). U prilog tome, da podstiče oksidativni stres govori činjenica da može inaktivirati glutation, kao i da produkuje homocistein-tiolakton koji se smatra toksičnim za ćelije i potentnim inicijatorom produkcije slobodnih radikala (Yilmaz, 2012). Kod hiperhomocisteinemije smanjena je ekspresija PON1 gena u jetri, što bi mogao biti još jedan od mehanizama pojačanog oksidativnog stresa (Yilmaz, 2012).

Ustanovljeno je da je hiperhomocisteinemija povezana sa smanjenom ekspresijom ApoA1 kod miševa i muškaraca sa oboljenjima koronarnih arterija (Mikael i sar., 2006). U skladu sa tim, neki radovi prijavljuju negativnu korelaciju između homocisteina i koncentracije HDL-a (Daly i sar., 2009; Vanderjagt i sar., 2004). Polinezasićene masne kiseline igraju ulogu u metaboličkim putevima homocisteina, i povećan unos ovih masnih kiselina snižava koncentraciju homocisteina (Rizzo i Laganà, 2020).

2.3.2. Homocistein i patološka stanja kože

Kod pacijenata sa psorijazom prisutna je hiperhomocisteinemija i ustanovljena je korelacija između koncentracije homocisteina i stepena oštećenja tkiva (Lin i sar., 2019). Homocistein stimuliše aktivaciju Th17 ćelijskog odgovora, koji igra značajnu ulogu u patologiji psorijaze (Gao i sar., 2018). Postoje hipoteze o povezanosti homocisteina sa sklerozom i starenjem kože (Motegi i sar., 2014; Namazi i Feily, 2011). Prisustvo pendulirajućih bradavica – *acrochordon*-a, je povezano sa višim koncentracijama homocisteina (El Safoury i sar., 2013). Papulopustularna rozacea je hronično inflamatorno oboljenje kože, i iako nije postojala razlika između koncentracije homocisteina između grupe obolelih i kontrolne grupe, primećena je korelacija između težine kliničke slike i koncentracije homocisteina (Chung i sar., 2022). Pacijenti koji boluju od vitiliga imaju više koncentracije homocisteina, više koncentracije LDL-a i niže koncentracije HDL-a nego zdrave kontrole (Taneja i sar., 2020). Iako nije ustanovljena jasna veza između mutacije C677T na MTHFR genu, koja podrazumeva smanjenu aktivnost ovog enzima, i atopijskog dermatitisa, istraživači su došli do zaključka da kod dece sa ovom mutacijom postoji pozitivna korelacija između vrednosti folata i rizika od nastanka ekcema (Van Der Valk i sar., 2013). Kod miševa deficijentnih cistation- β -sintetazom, enzimom koji konvertuje homocistein u cistein, pojavljuje se naborana koža sa hiperkeratozom i istanjenim dermisom (Robert i sar., 2004). Takođe kod štenaca izbalansiran unos cisteina i metionina, aminokiselina između kojih se u metaboličkim putevima nalazi homocistein, je bitan za homeostazu kože. Ukoliko štenci dobijaju manje količine metionina od potrebnih, dolazi do opadanja dlake i

razvoja ulceroznih promena na koži šapa, vrata i repa. Efekat je bio još izraženiji ukoliko su uz manje količine metionina dodaju veće količine cisteina, ali kada se ishrani doda L-metionin, efekti se saniraju (Hirakawa i Baker, 1985). Nedostatak metionina se takođe navodi kao ključni faktor pojave atopijskog dermatitisa kod NC/Nga miševa (soj miševa koji pokazuje spontani nastanak atopijskog dermatitisa sa 8 nedelja starosti) (Koga i sar., 2021). Na malom broju pasa sa dermatitisima različite etiologije u serumu su detektovane više koncentracije homocisteina nego kod zdravih pasa (Kakimoto i sar., 2014).

3. CILJEVI I ZADACI DOKTORSKE DISERTACIJE

Značaj atopijskog dermatitisa je u kontinuiranom porastu. Patogenetski mehanizmi ovog oboljenja se pripisuju složenoj interakciji naslednih i faktora sredine u kojoj psi borave. Dosadašnja istraživanja su nadogradila njihovo početno razumevanje, koje se najvećim delom zasnivalo na reakcijama I tipa preosetljivosti. Nedvosmisleno je naglašena uloga disfunkcionalne kožne barijere, promene u funkcionisanju keratinocita kao regulatora lokalnog imunskog odgovora, te narušena homeostaza mikrobioma kože. Izuzetno je izazovno proniknuti u hijerarhijsku strukturu navedenih faktora, no neosporna je činjenica da oni deluju sinergistički, čime se otvara mogućnost da intenzitet inflamatornog odgovora preraste iz lokalnog u sistemski. Savremena shvatanja o budućnosti terapijskog pristupa atopijskog dermatitisa kao cilj označavaju smanjenje ili korekciju štetnih efekata pojačanog lokalnog i sistemskog inflamatornog odgovora. Takođe, metabolomska istraživanja kože zahvaćene atopijskim dermatitisom navode narušenu ravnotežu u metabolizmu metionina, kao prekurzora pojedinih biogenih amina koji pokazuju imunomodulatorna svojstva, pri tome naglašavajući mogućnost da se promene dešavaju u sistemu međusobne konverzije metionina i homocisteina.

Prisustvo sistemske inflamacije kod pasa sa atopijskim dermatitisom nije ispitano u zadovoljavajućoj meri. Takođe, u literaturi su prisutni podaci o hiperhomocisteinemiji kod pasa sa kožnim oboljenjima uopšteno, međutim nema preciznih navoda o promenama koncentracije kod atopijskog dermatitisa. Shodno navedenom, cilj doktorske disertacije je da se kod pasa sa atopijskim dermatitisom utvrdi prisustvo, odnosno stepen sistemske inflamacije, merenjem koncentracija reaktanata akutne faze u serumu, te da se proceni povezanost intenziteta inflamacije sa promenama u koncentraciji Hcy i dislipidemijom.

U skladu sa postavljenim ciljem definisani su sledeći zadaci:

1. Za grupu pasa kojima je dijagnostikovao atopijski dermatitis, a u remisiji su, te dolaze na kontrolni pregled i dijagnostičko intradermalno alergološko testiranje, prikupiti kliničke, anamnestičke, i podatke o rezultatima hematoloških i laboratorijskih testiranja. Takođe, prikupiti analogne podatke za kontrolnu grupu zdravih pasa koji dolaze na redovnu preventivnu kontrolu zdravstvenog stanja.
2. U višku seruma, nakon navedenih ispitivanja, uraditi analizu zastupljenosti lipoproteinskih frakcija, odrediti koncentracije tj. aktivnosti reaktanata akutne faze (serum amiloida A, ceruloplazmina, paraoksonaze i apolipoproteina A1) i koncentraciju homocisteina.
3. Uporediti rezultate hematoloških i biohemijskih analiza, zastupljenost lipoproteinskih frakcija odnosno koncentracije reaktanata akutne faze i homocisteina između kontrolne i celokupne grupe pasa sa atopijskim dermatitisom, odnosno između pasa brahicefaličnih i mezocefaličnih rasa unutar grupe sa atopijskim dermatitisom.
4. Utvrditi povezanost koncentracije proteina akutne faze i homocisteina sa ostalim kliničkim, demografskim i laboratorijskim podacima. U deponovanim uzorcima pacijenata kojima je na osnovu kliničkih i laboratorijskih podataka bilo utvrđeno prisustvo akutne ili hronične sistemske inflamacije odrediti koncentracije serum amiloida A i homocisteina, te uporediti dobijene vrednosti sa vrednostima kod pasa sa atopijskim dermatitisom.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Životinje, eksperimentalne grupe

4.1.1. Kriterijumi za dijagnostiku atopijskog dermatitisa

Grupu pasa sa atopijskim dermatitisom sačinjavala su 54 pacijenta dermatološke ambulante Nastavne bolnice za male životinje, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu (FVM UB). Pacijentima je dijagnostikovano atopijski dermatitis tokom 2022. godine na osnovu prvog seta *Favrot*-ovih kriterijuma (Hensel i sar., 2015):

- 1) Simptomi su se prvi put pojavili pre navršene tri godine života.
- 2) Pas pretežno boravi u kućnim uslovima.
- 3) Terpija kortikosteroidima pokazuje efekat na pruritus.
- 4) Pojava hroničnih ili ponavljajućih gljivičnih infekcija.
- 5) Zahvaćeni su prednji ekstremiteti.
- 6) Zahvaćene su ušne školjke.
- 7) Nisu zahvaćene margine uva.
- 8) Nije zahvaćen dorzo – lumbalni predeo.

Anamnezom i kliničkim pregledom je procenjivano koliko je kriterijuma ispunjeno. Druga patološka stanja su isključena klasičnim dermatološkim metodama: analizom briseva kože, proverom prisustva ektoparazita (buva, *Demodex canis*-a, grinja), skarifikacijom, trihogramom, citološkim pregledom kože i spoljašnjeg ušnog kanala. Anamnestički podatak o tzv. eliminacionoj dijeti isključivao je nutritivnu alergiju kod ispitivanih pasa. Ukoliko je postojalo paralelno patološko stanje, pacijent je isključen iz istraživanja. Krv je uzorkovana psima prilikom dolaska na intradermalno alergološko testiranje, u novembru 2022. godine. Ovaj period je izabran jer je prethodno završena polenacija, te je prisustvo alergena iz spoljašnjeg okruženja na minimumu, a grejna sezona je na početku, te nivo alergena nije dostigao vrednosti koje bi uzrokovale interferencije. Farmakološka terapija obustavljena je u odgovarajućem periodu pre uzorkovanja krvi. Za terapiju glukokortikoidima, period je bio u rasponu 8–12 nedelja, kada su primenjivani injekciono, odnosno najmanje 4 nedelje u slučaju topikalne i primene *per os*. Preparate na bazi masnih kiselina, namenjene topikalnoj ili *per os* primeni, bilo je potrebno obustaviti najmanje 24 dana. Antihistaminici su imali najkraći period prekida u primeni, koji je iznosio najmanje 10 dana. U trenutku uzorkovanja krvi, na koži pasa se nisu uočavale nikakve promene, niti znaci gljivičnih ili bakterijskih infekcija.

Među pacijentima je bilo 36 mužjaka i 18 ženki. Medijana starosti iznosila je 3 godine, a raspon minimalna–maksimalna starost 1–7 godina. Kod 29 pacijenata bilo je ispunjeno pet *Favrot*-ovih kriterijuma, a kod 25 pacijenata 6. Najzastupljenija rasa bio je francuski buldog (n=11), potom mešanac (n=6) i bišon (n=4). Rase mops, engleski buldog i šiba inu bile su zastupljene sa po tri psa, a rase srednja pudla, ridžbek, pinč, zapadnoškotski terijer i američki stafordski terijer sa po dva psa. U istraživanje su bili uključeni i po jedan bigl, nemački ovčar, tulearski pas, dalmatinac, argentinska doga, nemački špic, pit bul terijer, labrador, mađarska vižla, *Jack Rusell* terijer, malinoa, minijaturni šnauer, maltezer i ši-cu. U ispitivanoj grupi pasa bilo je 18 pasa brahicefaličnih, i 36 pasa mezocefaličnih rasa.

4.1.2. Zdravi psi

Kontrolnu grupu su predstavljala 26 zdravih pasa koji su došli na redovnu proveru zdravstvenog stanja u periodu od 2017. do 2022. godine. Nakon pregleda i laboratorijskih ispitivanja nisu

ustanovljena klinički značajna odstupanja od fizioloških, odnosno referentnih vrednosti za hematološke i biohemijske analize. Negativni rezultati na SNAP 4Dx testu (IDEXX Laboratories Westbrook, ME, USA) isključili su infekcije sa *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia burgdorferi* i *Dirofilaria immitis*. Starost u kontrolnoj grupi je imala medijanu 4 godine, odnosno raspon minimalna–maksimalna starost 0,5–11,0 godina. Među psima u kontrolnoj grupi bilo je 18 mužjaka i 8 ženki. Najzastupljeniji su bili mešanci (n=9). Pored njih bila su uključena po dva ši-cu-a, labradora, američka stafordska terijera, te po jedan samojed, oštrodlaki nemački ptičar, kratkodlaki nemački ptičar, akita inu, jazavičar, pinč, zlatni retriever, srednja pudla, američki buldog, bigl, i nemački ovčar.

Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja FVM UB izdala je mišljenje (broj 10-6/2022) kojim je odobrila studiju.

4.1.3. Psi sa stanjima koje karakteriše različit intenzitet i dužina trajanja inflamatornog procesa

Dodatnu grupu u studiji je predstavljao 51 pas kod kojih je dijagnostikovane dirofilarioza, babezioza ili piometra, koje su izabrane kao primeri stanja koje karakteriše različit intenzitet i dužina trajanja inflamatornog procesa. Ovakva grupa bila je neophodna da bi se procenio uticaj akutne i hronične inflamacije na promenu nivoa homocisteina, odnosno uporedio sa podacima dobijenim kod pasa sa atopijskim dermatitisom. Psi su bili pacijenti Nastavne bolnice FVM UB u periodu između februara 2017. i decembra 2019. godine.

Grupu pasa sa dirofilariozom, (n=31, 17 mužjaka i 14 ženki) sačinjavalo 13 mešanaca, po tri nemačka oštrodlaka ptičara i labrador retrievera, po dva zlatna retrievera, epanjel bretona, springer španijela, nemačka kratkodlaka ptičara, i po jedan stafordski terijer, malinoa, rotvajler, i nemački ovčar. Rezultati SNAP 4Dx testa (IDEXX Laboratories Westbrook, ME, USA) ukazivali su na prisustvo antigena *D. immitis*, pri čemu su bili negativni na sve druge, za naše područje uobičajene, vektorski prenosive bolesti. Medijana starosti ove grupe je bila 5, sa rasponom minimalna–maksimalna starost 2–11 godina. Sem 6 pasa koji su pokazivali blage simptome u formi blagog kašlja, ostali psi su bili asimptomatski, tako da je cela grupa pripadala dirofilariozi 1. stepena (Kosić i Lalošević, 2020). U grupi pasa sa babeziozom (n=12, 7 mužjaka i pet ženki) bilo je pet mešanaca, dva zlatna retrievera, i po jedan akita inu, malinoa, šar pei, jazavičar i maltezer. Psi su primljeni u Nastavnu bolnicu FVM UB na pregled, zbog pojave simptoma koji ukazuju na babeziozu. Groznicu, anoreksiju i hemoglobinuriju su pratili hematološki rezultati, kao što su trombocitopenija, blaga ili umerena anemija i prisustvo trofozoita parazita iz grupe velikih babezija (Spariosu i sar., 2021). Kasnije je PCR metodom kod svih pasa utvrđeno prisustvo *B. canis*. Medijana starosti ove grupe je bila 4 godine, a raspon minimalna–maksimalna starost 1–15 godina. U grupi sa piometrom (n=8) našle su se tri mešanke i po jedna ženka rase bigl, zlatni retriever, labrador retriever, doberman, i nemački oštrodlaki ptičar. Piometra je dijagnostikovana na osnovu kliničkih znakova, kao što su poliurija, polidipsija, groznica i apatija, a potom je laboratorijskim analizama i ultrazvučnim pregledom dijagnoza i potvrđena (Hagman, 2018). Medijana starosti ove grupe je bila 4, sa rasponom minimalna–maksimalna starost 2–6 godina. Psi su isključivani iz studije ukoliko je postojalo prisustvo bilo kog dodatnog patološkog stanja kao što su rane, neoplazije, endokrinopatije, alergije itd. Pomenutim grupama priključena je i grupa zdravih pasa (n=6; tri mužjaka i tri ženke): tri mešanca, i po jedan nemački kratkodlaki ptičar, nemački oštrodlaki ptičar, i labrador. Starost (medijana (minimum–maksimum) ove grupe bila je 2 (1–6) godine.

Etička komisija FVM UB odobrila je ovo istraživanje, i dozvolu je izdalo i Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (broj 323-07-03455/2015-05/3).

4.2. Osnovne hematološke i biohemijske analize

Krv je uzorkovana krv punkcijom *vena cephalica antebrachi*, u dve epruvete, jednu sa EDTA kao antikoagulansom i drugu bez antikoagulansa. Uzorak iz epruvete sa EDTA bio je namenjen za

hematološke analize. Druga epruveta je nakon koagulacije krvi centrifugirana 15 minuta na 1500g. Iz izdvojenog seruma su urađene osnovne biohemijske analize, a ostatak je namenjen za određivanje koncentracija pokazatelja sistemske inflamacije, odnosno homocisteina, kao i za elektroforezu lipoproteina. Serum je alikvotiran u manje količine i zamrznut na -20°C.

Za hematološka ispitivanja korišćeni su analizatori Idexx Procyte Dx (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA) i Mindray BC5000 (Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen, P.R. China). Osnovne biohemijske analize podrazumevale su određivanje albumina, ukupnih protein, alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze, alkalne fosfataze, gama glutamil transferaze, holesterola, triglicerida, uree, kreatinina, gvožđa, i glukoze. Za analizu su korišćeni komercijalni reagensi (Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd. Shenzhen, P.R. China) na analizatoru Mindray BS240, istog proizvođača.

4.3. Elektroforeza lipoproteina

Lipoproteini su elektroforetski razdvajani na 1% agaroznim gelovima sa dodatkom 0,5% goveđeg albumina, pripremljeni u barbiturnom puferu (pH=8,6). Razdvajanje je trajalo 45 minuta, korišćenjem napona od 80V i barbiturnog pufera (pH=8,6). Nakon vizulizacije razdvojenih frakcija tehnikom zasnovanom na upotrebi *Fat Red-a*, gelovi su skenirani (Epson Perfection V800 Scanner, Seico Epson Corp., Indonesia), nakon čega su, korišćenjem programa TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, UK), analizirani kako bi se odredio udeo razdvojenih frakcija: HDL2 tj. α_1 (eng. *high-density lipoproteins*), HDL1 tj. α_2 i TRL (eng. *triglyceride rich lipoproteins*), koja predstavlja sumu VLDL (eng. *very low-density lipoproteins*) tj. pre- β i LDL (eng. *low-density lipoproteins*) tj. β lipoproteina (Kawasumi i ostali, 2014; Milanović, 2018).

4.4. Određivanje koncentracije apolipoproteina A1

Koncentracija apolipoprotein A1 (ApoA1) je određena komercijalnim ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) paketom reagenasa (Canine Apolipoprotein A1/ApoA1 ELISA kit, Novus Biologicals, Contennial, Colorado, USA). Princip testa se zasnivao na kompetitivnoj ELISA-i. Na dno udubljenja mikrotitarske ploče je adsorbovan ApoA1, koji sa molekulima ApoA1 iz uzorka „takmiči“ za vezivanje sa antitelom konjugovanim sa HRP-om (engl. *horseradish peroxidase*). Nakon uklanjanja bevezanog materijala ispitanjem, dodavanjem TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) kao supstrata za HRP, te podešavanja pH, intenzitet boje nastalog proizvoda se merio spektrofotometrijski na na ELISA čitaču (Elx800, Biotek). Koncentracija Apo A1 u uzorku je bila obrnuto proporcionalna intenzitetu obojenja. Za izračunavanje jednačine standardne krive korišćeno je 8 koncentracija komercijalnog standarda (1800 $\mu\text{g/L}$, 900 $\mu\text{g/L}$, 450 $\mu\text{g/L}$, 225 $\mu\text{g/L}$, 112,5 $\mu\text{g/L}$, 56,25 $\mu\text{g/L}$ 28,12 $\mu\text{g/L}$, i 0 $\mu\text{g/L}$). Rezultati izraženi u g/L.

4.5. Određivanje koncentracije serum amiloida A

Koncentracija serum amiloida A (SAA) određivana je komercijalnim ELISA paketom reagenasa (Tridelta SAA multispecies ELISA, Ireland). Princip metode zasnivao se na „sendvič“ ELISA-i koji su sačinjavala monoklonska antitela specifična za SAA, adsorbovana za dno udubljenja mikrotitarske ploče, molekuli SAA iz uzorka, i naknadno dodata anti-SAA antitela obeležena HRP-om dolazi do stvaranja „sendviča“. Po odstranjenju viška uzorka i reagenasa, dodatka supstrata TMB-a, i podešavanja pH formira se jedinjenje žute boje, čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji SAA u uzorku. Absorbanca na 450 nm je očitavana na ELISA čitaču (Elx800, Biotek). Prema uputstvu proizvođača, za izračunavanje regresione jednačine korišćeno je 6 koncentracija komercijalnog standarda (ng/ml, 80 ng/mL, 40 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL i 0 ng/mL). Vrednosti su izražene u mg/L.

4.6. Određivanje koncentracije ceruloplazmina

Metoda korišćena za određivanje koncentracije ceruloplazmina (CER) zasnovana je na njegovim oksidaznim svojstvima. Apsorbancija proizvoda nastala njegovim delovanjem na p-fenilendiamin merena je na spektrofotometru Cecil 2021 2000 Series[®] (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija), a koncentracija izračunavana korišćenjem kalibracionog faktora. Vrednosti su izražene u g/L (Janjić, 2021, Spariosu, 2022).

4.7. Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1

Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) je određivana preko brzine nastajanja 4-nitrofenola, koji predstavlja proizvod delovanja PON1 na sintetički supstrat, 4-nitrofenil acetat. Apsorbancija 4-nitrofenola merena je na spektrofotometru Cecil 2021 2000 Series[®] (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija). Za izračunavanje je korišćena vrednost molarnog apsorpcionog koeficijenta 4-nitrofenola. Vrednosti su izražene u U/L (Janjić, 2021, Spariosu, 2022).

4.8. Određivanje koncentracije homocisteina

Koncentracija homocisteina (Hcy) je određivana metodom CMIA (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*) na ARCHITECT ci8200 Integrated System (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) korišćenjem reagenasa istog proizvođača. Princip metode se zasniva na enzimskom prevođenju homocisteina u S-adenozil homocistein (SAH), koji se „takmiči“ sa SAH-om koji je obeležen akridinijumom za vezivanje sa monoklonskim antitelom kojim su obložene mikročestice. Intenzitet tako nastale hemiluminiscencije je obrnuto proporcionalan koncentraciji Hcy u uzorku. Rezultati su izraženi u $\mu\text{mol/L}$ (Beletić, 2014)

4.9. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka obuhvatila je metode deskriptivne statistike, *Mann-Whitney U-test*, *Kruskal-Wallis test* sa *post-hoc* analizom po *Conover-u*, *Spearman-ovu* korelaciju, kao i multiplu regresiju analizu. Podaci su analizirani statističkim programom MedCalc[®] (version 16.2.1, Ostend, Belgium).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati u kontrolnoj i grupi pasa sa atopijskim dermatitisom

Starost (medijana (minimum–maksimum)) u grupi kontrolnih pasa (n=26) iznosila je 4 (0,5–11) godina. Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom (AD) (n=54) bila je starosti 3 (1–7) godina. Poređenje nije ukazalo na razliku između grupa (P=0,372).

5.1.1. Hematološki pokazatelji

Grupa pasa sa AD imala je veći broj eritrocita (Figura 4A), hematokrit (Figura 4B) i prosečnu širinu krive raspodele vrednosti zapremine eritrocita (eng. *red blood cell distribution width* (RDW)) (Figura 4C) u odnosu na grupu kontrolnih pasa.

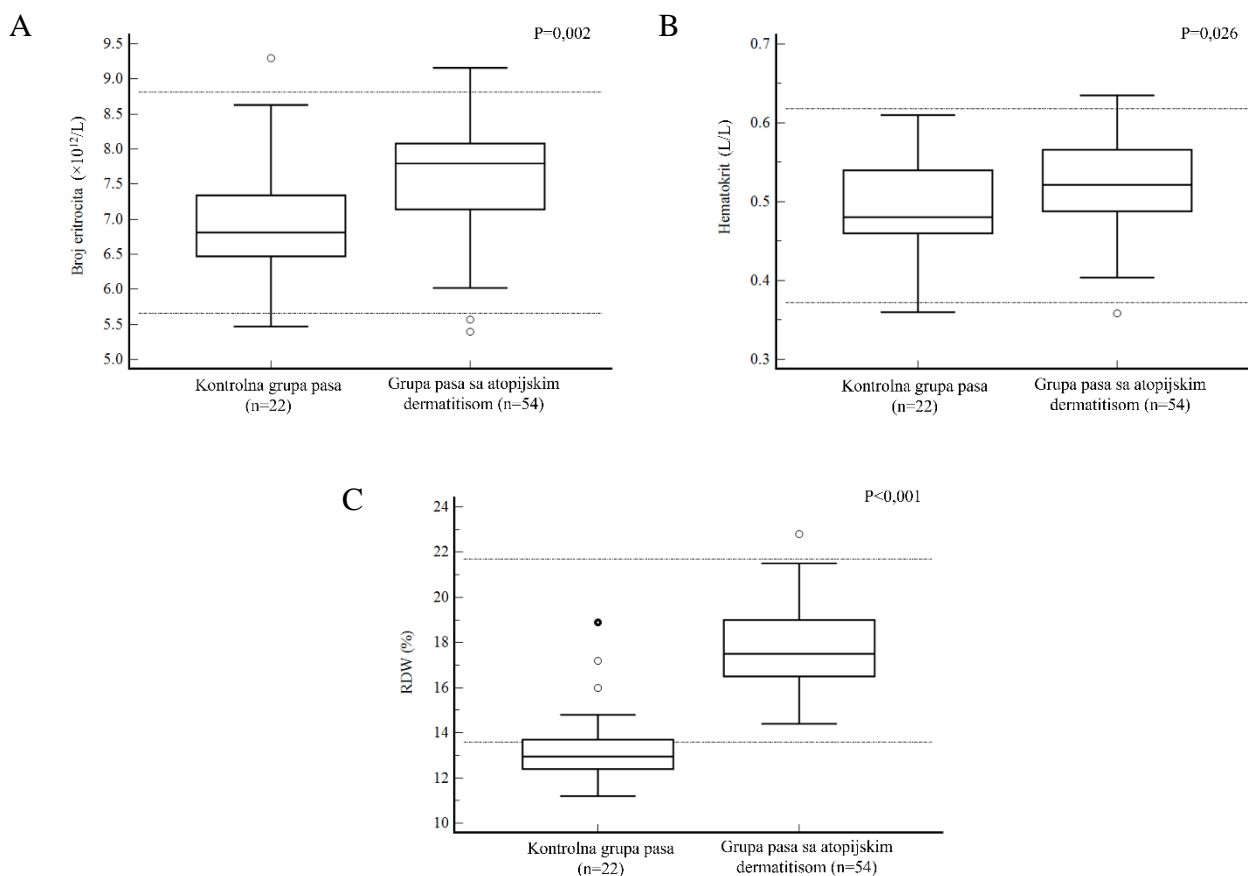


Figura 4. Poređenje (A) broja eritrocita, (B) hematokrita, i (C) širine krive raspodele vrednosti zapremine eritrocita (eng. *red blood cell distribution width* (RDW)). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

U koncentraciji hemoglobina, prosečnoj zapremini eritrocita (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)) i prosečnoj koncentraciji hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)) nije bilo razlike (Tabela 3).

Tabela 3. Poređenje koncentracije hemoglobina, prosečne zapremine eritrocite (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)) i prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)).

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Kontrolna grupa pasa (n=22)	Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom (n=54)	P
Hemoglobin (g/L)	131–205	173 (153–186)	177 (169–187)	0,197
MCV (fL)	62–74	70 (64,9–72,7)	67 (65,0–72,5)	0,426
MCHC (g/L)	320–379	345 (334–362)	345 (325–352)	0,206

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Broj leukocita se nije razlikovao između grupe kontrolnih pasa i grupe pasa sa AD. Međutim, medijana apsolutnog broja eozinofila je bila duplo veća u grupi pasa sa AD nego u kontrolnoj grupi. Ostali parametri diferencijalne leukocitarne formule nisu se razlikovali između grupa (Tabela 4).

Tabela 4. Poređenje broja leukocita i parametara diferencijalne leukocitarne formule.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Kontrolna grupa pasa (n=22)	Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom (n=54)	P
Leukociti ($\times 10^9/L$)	5,1–16,8	10,7 (8,8–13,2)	11,3 (9,0–13,2)	0,559
Neutrofili ($\times 10^9/L$)	2,9–11,6	7,9 (5,7–8,9)	7,6 (6,0–9,7)	0,578
Limfociti ($\times 10^9/L$)	1,1–5,1	1,8 (1,5–3,4)	2,1 (1,6–2,6)	0,881
Monociti ($\times 10^9/L$)	0,2–1,1	0,5 (0,3–0,7)	0,6 (0,4–0,7)	0,084
Eozinofili ($\times 10^9/L$)	0,1–1,2	0,2 (0,0–0,5)	0,4 (0,3–0,6)	0,002
Bazofili ($\times 10^9/L$)	0,0–0,1	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,396

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Ispitivane grupe su imale broj trombocita koji se nije razlikovao. No, poređenje vrednosti prosečne zapremine trombocita (eng. *mean platelet volume* (MPV)) ukazalo je da su trombociti kod grupe pasa sa AD veći nego u kontrolnoj grupi (Tabela 5).

Tabela 5. Poređenje broja trombocita i prosečne zapremine trombocita (eng. *mean platelet volume* (MPV)).

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Kontrolna grupa pasa (n=22)	Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom (n=53)	P
Trombociti ($\times 10^9/L$)	148–484	237 (189–261)	247 (195–325)	0,352
MPV (fL)	8,7–13,2	9,9 (8,7–12,2)	11,2 (10,4–12,6)	0,023

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Ne prenebregavajući uočene razlike, za vrednosti hematoloških parametara se uopšteno može reći da su najvećim delom bile u okviru referentnih intervala (Figura 4, Tabele 3–5).

5.1.2. Biohemijski pokazatelji

Grupa pasa sa AD je imali veće koncentracije ukupnih proteina (Figura 5A), globulina (Figura 5B), i niži odnos albumina i globulina u serumu (Figura 5C). Kod pasa sa AD zabeležena je niža aktivnost alkalne fosfataze (Figura 6A) kao i gama glutamil transferaze (Figura 6B) nego grupa zdravih pasa. Nasuprot tome, glikemija je imala veće vrednosti (Figura 6C). Razlike između ispitivanih grupa nisu pokazane za nivoe alanin aminotransferaze, aspartata aminotransferaze, kreatinina, uree, gvožđa i albumina (Tabela 6). Koncentracija holesterola u serumu (Figura 7A), kao i zastupljenost HDL1 (eng. *high-density lipoprotein*) nakon elektroforeze lipoproteina (Figura 7B) bile su niže u grupi pasa sa AD. U serumskim koncentracijama triglicerida i apolipoproteina A1 nije bilo razlike između grupa. Do istog zapažanja došlo se i prilikom poređenja zastupljenosti ostalih frakcija nakon elektroforeze lipoproteina (Tabela 7). Takođe, i za biohemijske pokazatelje se može primetiti da su u najvećoj meri bili u opsegu referentnih intervala, ne prenebregavajući značaj prisutnih razlika između grupa.

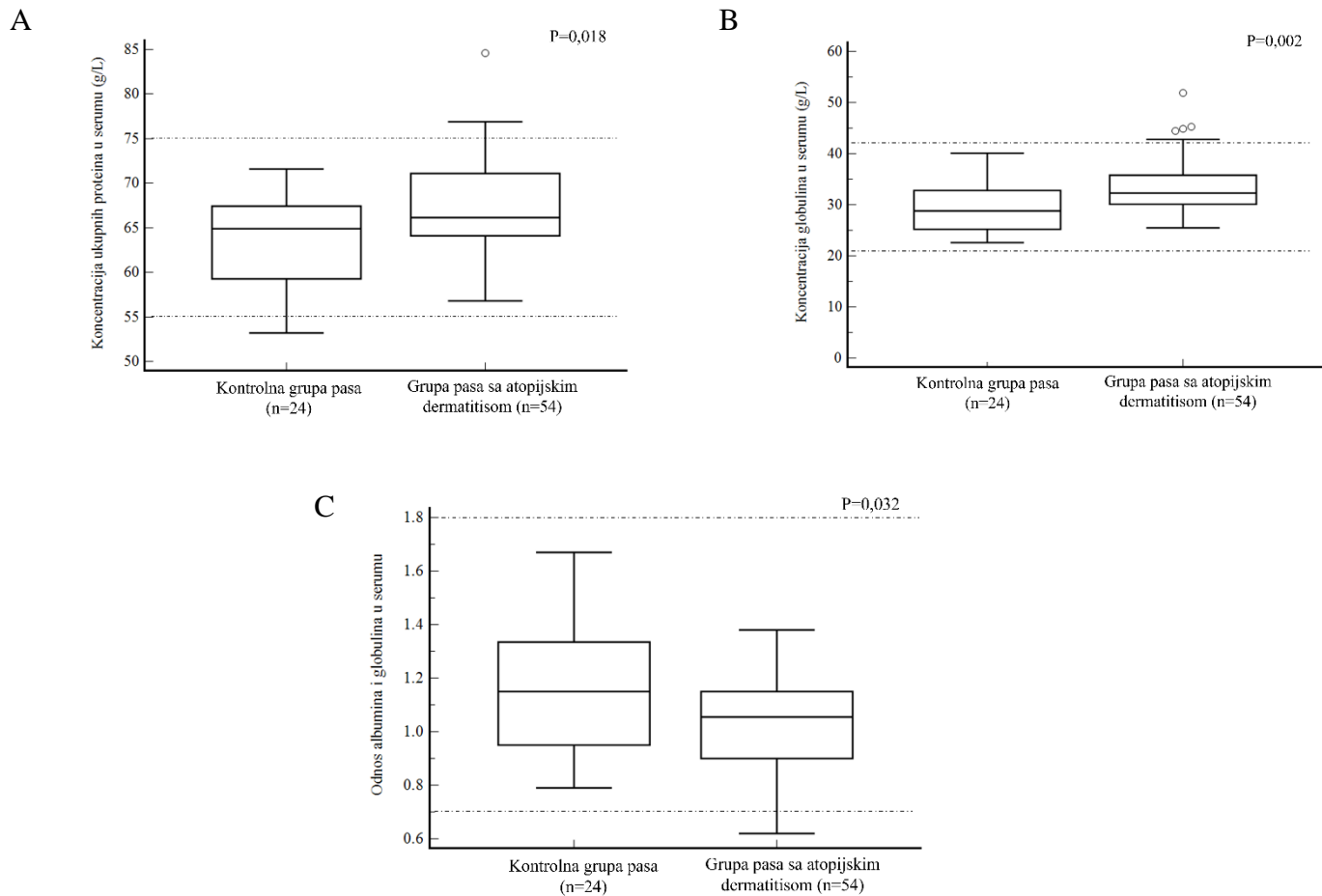


Figura 5. Poređenje nivoa (A) ukupnih proteina, (B) globulina, i (C) odnosa albumina i globulina u serumu. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney U-test*, $P < 0,05$ je značajna.

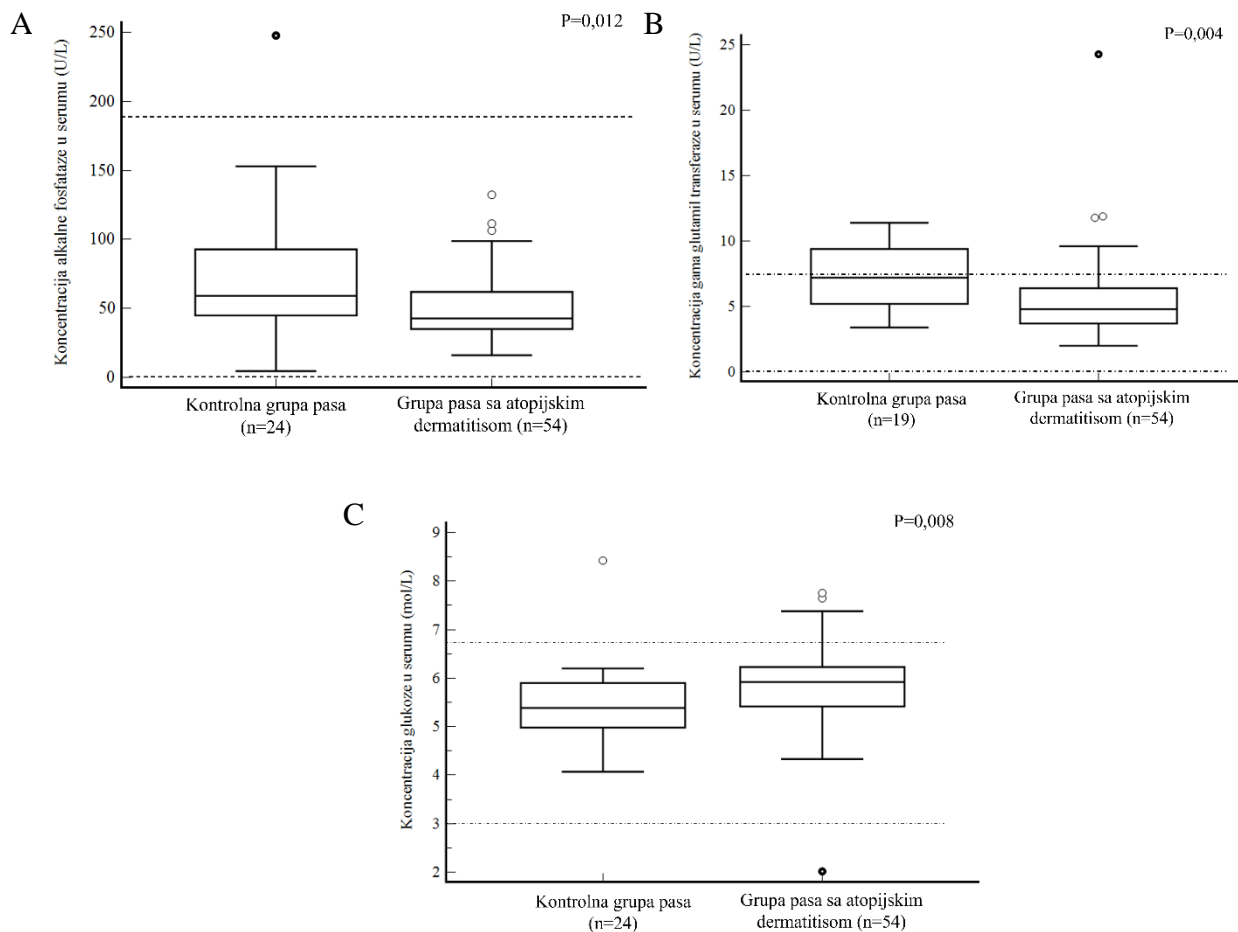


Figura 6. Poređenje aktivnosti (A) alkalne fosfataze, (B) gama glutamil transferaze, i (C) koncentracije glukoze u serumu. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Tabela 6. Poređenje nivoa alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), kreatinina, uree i gvožđa (Fe).

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Kontrolna grupa pasa	Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom	P
ALT (U/L)	3–50	36 (31–52) ²⁴	43 (34–58) ⁵⁴	0,090
AST (U/L)	1–46	28 (23–31) ¹⁵	30 (24–39) ⁵⁴	0,069
Kreatinin (μmol/L)	50–169	23 (70–96) ²³	82 (63–95) ⁵⁴	0,479
Urea (mmol/L)	3,3–9,2	6,0 (4,8–7,3) ²⁴	4,9 (4,3–6,1) ⁵⁴	0,098
Fe (μmol/L)	23–42	31 (20–44) ¹⁴	25 (22–36) ⁵³	0,532
Albumin (g/L)	25–40	32 (31–36) ²⁴	34 (32–35) ⁵⁴	0,296

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna. Broj u superskriptu predstavlja broj analiziranih uzoraka.

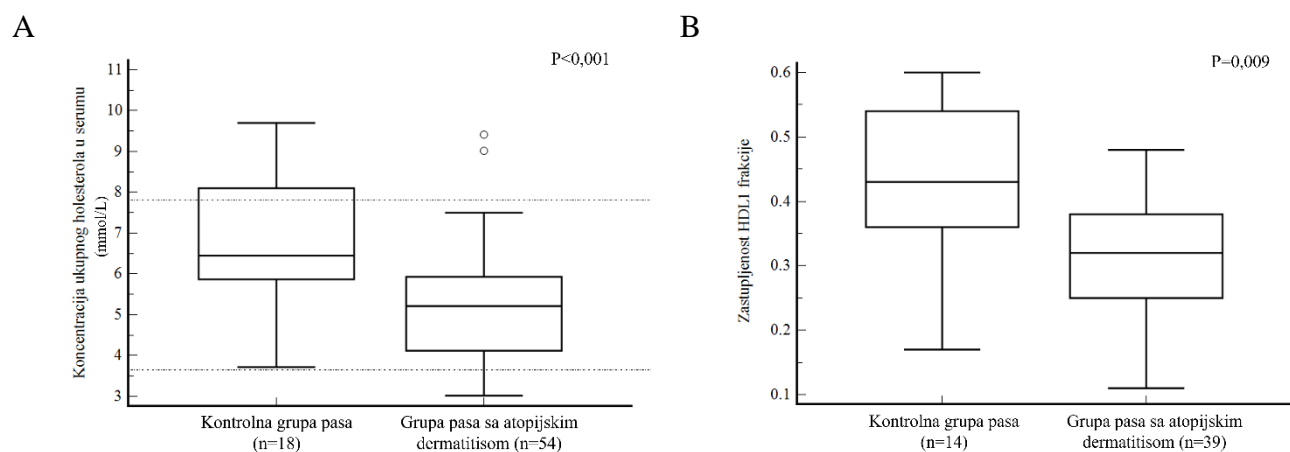


Figura 7. Poređenje (A) koncentracije ukupnog holesterola u serumu i (B) zastupljenosti HDL1 (eng. *high-density lipoproteins*) frakcije nakon elektroforeze lipoproteina. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Tabela 7. Poređenje koncentracija triglicerida (TRIG) i apolipoproteina A1 (ApoA1), te zastupljenosti frakcija hilomikrona, TRL (eng. *triglyceride-rich lipoproteins*), HDL2/3 (eng. *high-density lipoproteins*) i ukupnog HDL.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Kontrolna grupa pasa	Grupa pasa sa atopijskim dermatitisom	P
TRIG (mmol/L)	0,6–1,3	0,68 (0,50–0,80) ²¹	0,6 (0,40–0,70) ⁵⁴	0,376
ApoA1 (g/L)	/	0,82 (0,79–1,15) ¹⁴	0,84 (0,72–1,13) ³⁹	0,817
Hilomikroni	/	0,05 (0,03–0,11) ¹⁴	0,03 (0,02–0,06) ³⁵	0,548
TRL	/	0,17 (0,14–0,27) ¹⁴	0,24 (0,18–0,29) ³⁹	0,110
HDL2/3	/	0,37 (0,24–0,43) ¹⁴	0,43 (0,37–0,48) ³⁹	0,059
HDL ukupni	/	0,76 (0,71–0,84) ¹⁴	0,73 (0,67–0,78) ³⁹	0,138

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test,

P < 0,05 je značajna. Broj u superskriptu predstavlja broj analiziranih uzoraka, /–označava da ne postoji konsenzus oko referentnog opsega.

5.1.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein

Koncentracija serum amiloida A nije se razlikovala između ispitivanih grupa. Dodatno, uočava se i da je većina vrednosti bila u opsegu referentnog intervala (Figura 8).

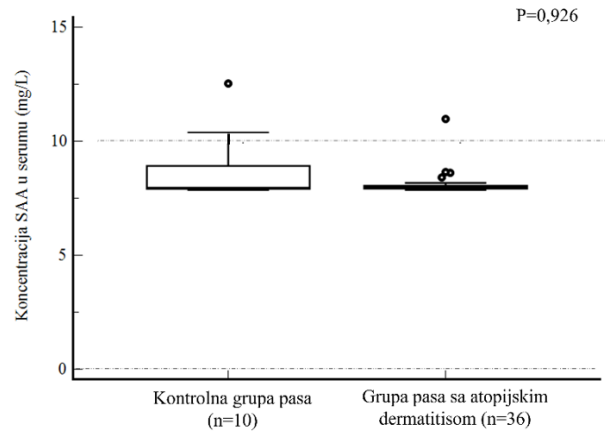


Figura 8. Poređenje koncentracije serum amiloida A (SAA). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Nivo ceruloplazmina je bio viši u grupi pasa sa AD. Dodatno, uočava se da je skoro kod većine pasa sa AD vrednost bila iznad gornje granice referentnog intervala (Figura 9).

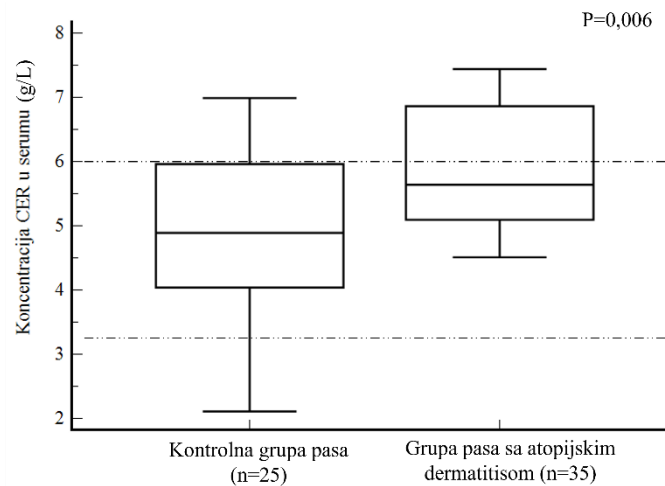


Figura 9. Poređenje koncentracije ceruloplazmina (CER). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Horizontalne linije predstavljaju referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

U aktivnosti PON1 nije bilo razlike između grupa, a vrednosti su najvećim delom bile u okviru referentnog intervala (Figura 10).

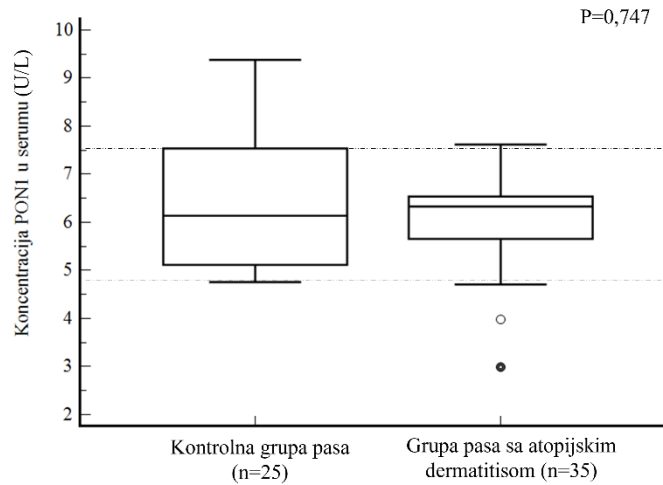


Figura 10. Poređenje aktivnosti paraoksonaze 1 (PON1). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney U-test*, $P < 0,05$ je značajna.

Indeks akutne faze, izračunat po formuli $(SAA \times CER)/(Albumin \times PON1)$, imao je veće vrednosti u grupi pasa sa AD (Figura 11).

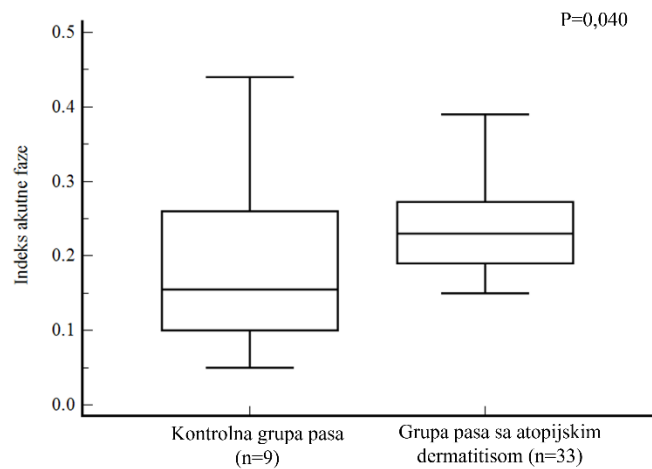


Figura 11. Poređenje indeksa akutne faze $(SAA \times CER)/(Albumin \times PON1)$. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. *Mann-Whitney U-test*, $P < 0,05$ je značajna.

Poređenjem nivoa homocisteina u serumu nisu uočene razlike između grupe pasa sa AD i kontrolne grupe (Figura 12).

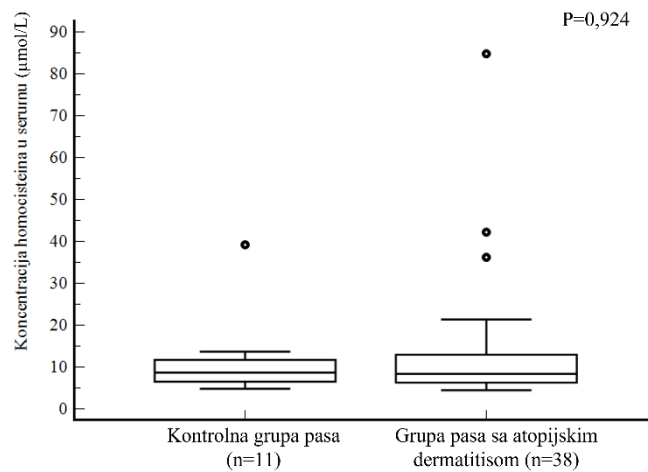


Figura 12. Poređenje Hcy. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. *Mann-Whitney U*-test, $P < 0,05$ je značajna.

5.2. Rezultati u grupama pasa mezocefaličnih i brahicefaličnih rasa sa atopijskim dermatitisom

Starost (medijana (minimum-maksimum)) u grupi pasa mezocefaličnih rasa (n=36) je iznosila 2 (1–7) godine. Grupa pasa brahicefaličnih rasa (n=18) je bila starosti 3 (1,5–7) godine. Nije postojala razlika između starosti ove dve grupe ($P=0,376$).

5.2.1. Hematološki pokazatelji

Grupa pasa brahicefaličnih rasa je imali niži broj eritrocita nego grupa pasa mezocefaličnih rasa (Figura 13A), i veću količinu hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin* (MCH)) (Figura 13B). U koncentraciji hemoglobina, vrednosti hematokrita, prosečnoj zapremini eritrocita (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)) i prosečnoj koncentraciji hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)) nije bilo razlike (Tabela 8). Broj neutrofila je bio viši kod pasa brahicefaličnih rasa (Figura 14A), pri čemu se ukupan broj leukocita i ostali parametri diferencijalne leukocitarne formule nisu razlikovali (Tabela 9). Dodatno, grupa pasa brahicefaličnih rasa je imala i veći broj trombocita (Figura 14B). Vrednosti prosečne zapremine trombocita (medijana (minimum-maksimum)) u grupi pasa brahicefaličnih rasa su iznosile 11,0 (10,3–11,5) fL, a u grupi mezocefaličnih rasa 11,5 (10,5–13,1) fL, te poređenje nije ukazalo na razliku ($P=0,098$). Osim za broj eritrocita, za vrednosti hematoloških parametara se uopšteno može reći da su najvećim delom bile u okviru referentnih intervala.

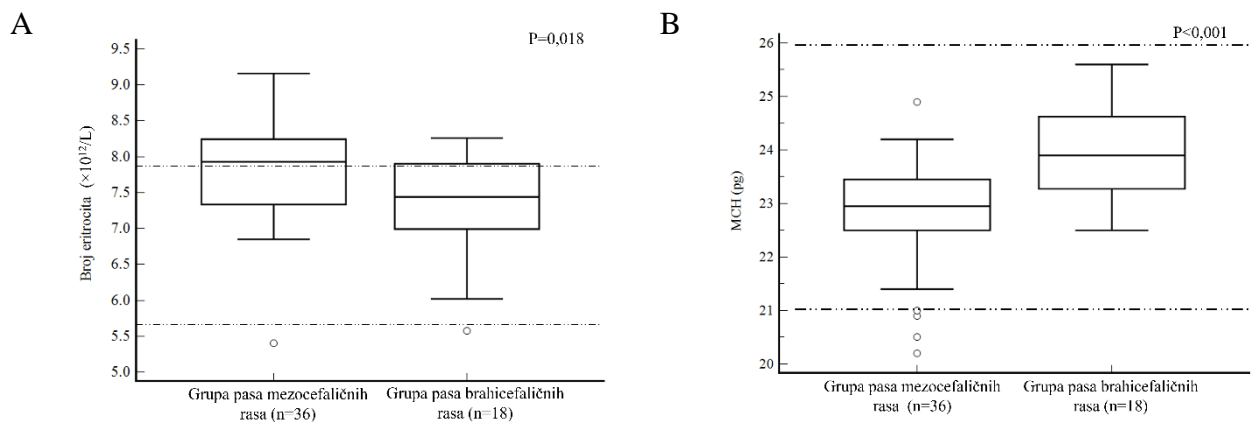


Figura 13. Poređenje (A) broja eritrocita i (B) količine hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin* (MCH)). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney U-test*, $P < 0,05$ je značajna

Tabela 8. Poređenje koncentracije hemoglobina, hematokrita, prosečne zapremine eritrocite (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)), prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)) i širine krive raspodele vrednosti zapremine eritrocita (eng. *red blood cell distribution width* (RDW)).

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Grupa pasa mezocefaličnih rasa (n=36)	Grupa pasa brahicefaličnih rasa (n=18)	P
Hemoglobin (g/L)	131–205	177 (171–190)	177 (169–187)	0,741
Hematokrit (L/L)	0,37–0,61	0,52 (0,49–0,57)	0,51 (0,48–0,55)	0,271
MCV (fL)	62–74	67 (64–71)	70 (67–73)	0,080
MCHC (g/L)	320–379	343 (322–352)	348 (329–353)	0,378
RDW (%)	13,6–21,7	17,6 (16,55–19,1)	17,0 (16,5–18,4)	0,468

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney U-test*,

$P < 0,05$ je značajna.

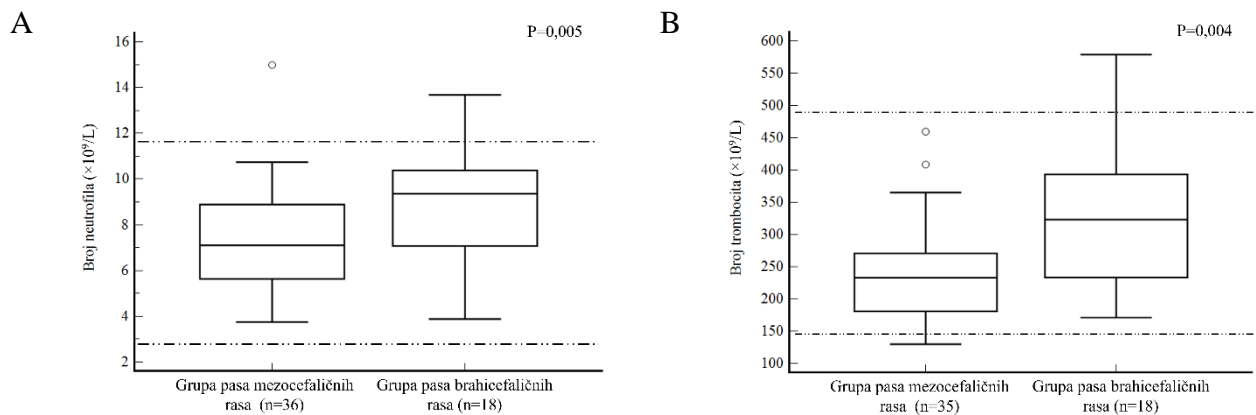


Figura 14. Poređenje (A) broja neutrofila i (B) broja trombocita. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna

Tabela 9. Poređenje ukupnog broja leukocita i parametara diferencijalne leukocitarne formule, i prosečne zapremine trombocita (eng. *mean platelet volume (MPV)*). .

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Grupa pasa mezocefaličnih rasa (n=36)	Grupa pasa brahicefaličnih rasa (n=18)	p
Leukociti ($\times 10^9/L$)	5,1–16,8	10,7 (8,5–13,0)	12,5 (9,6–14,2)	0,123
Limfociti ($\times 10^9/L$)	1,1–5,1	2,1 (1,8–2,4)	1,9 (1,5–2,7)	0,633
Monociti ($\times 10^9/L$)	0,2–1,1	0,5 (0,4–0,7)	0,6 (0,5–0,9)	0,093
Eozinofili ($10^9/L$)	0,1–1,2	0,5 (0,3–0,8)	0,4 (0,3–0,6)	0,388
Bazofili ($\times 10^9/L$)	0,0–0,1	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,962

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

5.2.2. Biohemijski pokazatelji

Između grupa pasa mezocefaličnih i brahicefaličnih rasa sa atopijskim dermatitisom nije bilo razlike u vrednostima ispitivanih biohemijskih parametara (Tabela 10).

Tabela 10. Poređenje nivoa glukoze (GLU), alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), alkalne fosfataze (ALP), gama glutamil transferaze (GGT), ukupnih proteina (TP), kreatinina, uree, gvožđa (Fe), albumina i globulina.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Grupa pasa mezocefaličnih rasa (n=36)	Grupa pasa brahicefaličnih rasa (n=18)	P
GLU (mmol/l)	3–6,7	5,9 (5,4–6,2)	5,9 (5,3–6,2)	0,912
ALT (U/L)	3–50	44 (36–60)	39 (30–55)	0,300
AST (U/L)	1–46	33 (24–41)	30 (26–36)	0,601
ALP (U/L)	0–190	41 (32–55)	49 (40–78)	0,065
GGT (U/L)	0–7	5 (4–6)	4 (4–7)	0,905
TP (g/L)	55–75	66 (64–69)	67 (63–72)	0,633
Kreatinin (μmol/L)	50–169	81 (62–96)	85 (71–95)	0,633
Urea (mmol/L)	3,3–9,2	5,3 (4,5–6,8)	4,7 (4,0–5,6)	0,595
Fe (μmol/L)	23–42	26 (22–37)	25 (19–35)	0,505
Albumin (g/L)	25–40	34 (33–35)	34 (31–35)	0,576
Globulini (g/L)	21–42	32 (30–35)	34 (30–38)	0,491

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Takođe, nije ustanovljena razlika u koncentraciji holesterola, triglicerida i apolipoproteina A1 između ispitivanih grupa. Do istog zapažanja došlo se i prilikom poređenja zastupljenosti lipidnih frakcija nakon elektroforeze lipoproteina (Tabela 11). Za biohemijske parametre može se primetiti da su pretežno bili u referentnom opsegu.

Tabela 11. Poređenje koncentracija triglicerida (TRIG), holesterola (HOL) i apolipoproteina A1 (ApoA1), te zastupljenosti frakcija hilomikrona, TRL (eng. *triglyceride-rich lipoproteins*), HDL1 (eng. *high-density lipoproteins*), HDL2/3 i ukupnog HDL.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	Grupa pasa mezocefaličnih rasa	Grupa pasa brahicerfaličnih rasa	P
TRIG (mmol/L)	0,6–1,3	0,6 (0,4–0,8) ³⁶	0,6 (0,5–0,7) ¹⁸	0,521
HOL (mmol/L)	3,6–7,7	5,3 (4,2–6,0) ³⁶	4,7 (3,8–5,5) ¹⁸	0,414
ApoA1 (g/L)	/	0,89 (0,77–1,13) ²⁶	0,85 (0,58–1,13) ¹³	0,648
Hilomikroni	/	0,03 (0,02–0,06) ²⁶	0,03 (0,02–0,05) ¹³	0,418
TRL	/	0,24 (0,17–0,29) ²⁶	0,24 (0,20–0,27) ¹³	0,780
HDL1	/	0,32 (0,21–0,38) ²⁶	0,32 (0,26–0,40) ¹³	0,566
HDL2/3	/	0,43 (0,36–0,52) ²⁶	0,43 (0,37–0,45) ¹³	0,527
HDL ukupni	/	0,73 (0,66–0,78) ²⁶	0,74 (0,68–0,78) ¹³	0,965

Vrednosti su prikazane kao medijana sa prvim i trećim kvartilom; *Mann-Whitney* U-test,

$P < 0,05$ je značajna. Broj u superskriptu predstavlja broj analiziranih uzoraka, /–označava da ne postoji konsenzus oko referentnog opsega.

5.2.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein

Koncentracije serum amiloida A (Figura 15) i ceruloplazmina (Figura 16), odnosno aktivnost paraoksonaze 1 (Figura 17) nije se razlikovala između brahicefaličnih i mezocefaličnih rasa. Sledstveno tome, ni vrednosti indeksa akutne faze, izračunatog po formuli $(SAA \times CER)/(Albumin \times PON1)$ se nisu razlikovale (Figura 18). Dodatno, uočava se da se većina vrednosti SAA i PON1 u obe ispitivane grupe nalazila u okviru intervala referentnih vrednosti, kao i da je kod nešto manje od polovine pasa u obe grupe koncentracija ceruloplazmina viša od gornje granice referentnog intervala.

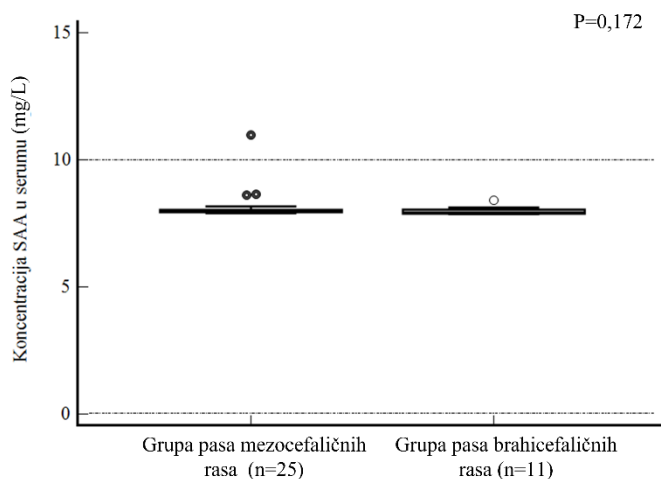


Figura 15. Poređenje koncentracije serum amiloida A (SAA). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

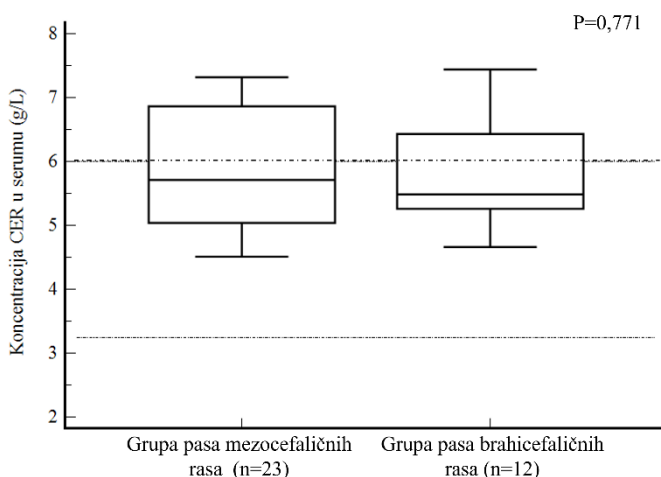


Figura 16. Poređenje koncentracije ceruloplazmina (CER). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Horizontalne linije predstavljaju referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

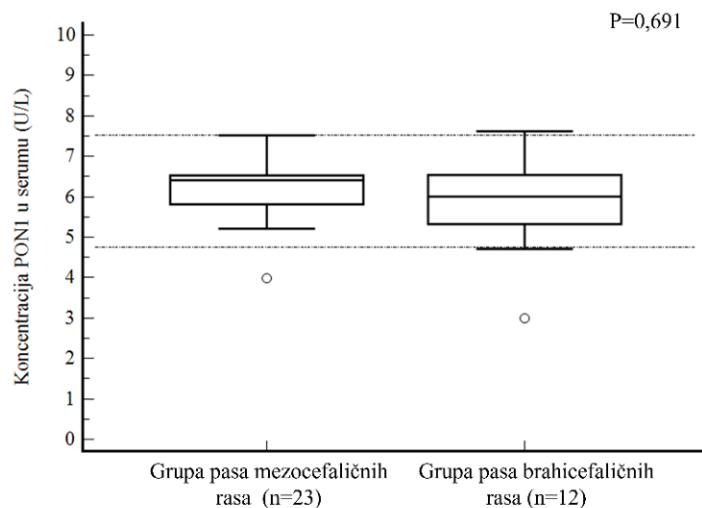


Figura 17. Poređenje aktivnosti paraoksonaze 1 (PON 1). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti, a horizontalne linije referentne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

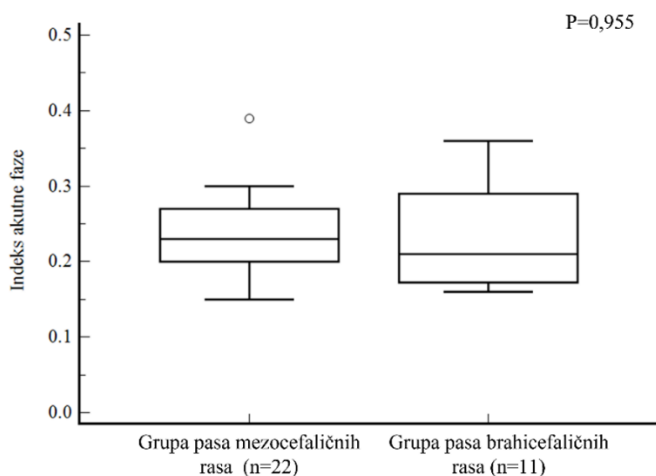


Figura 18. Poređenje indeksa akutne faze $(SAA \times CER)/(Albumin \times PON1)$. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

Poređenjem nivoa homocisteina u serumu, uočeno je da je grupa pasa brahicefaličnih rasa imali više vrednosti homocisteina od grupe pasa mezocefaličnih rasa (Figura 19).

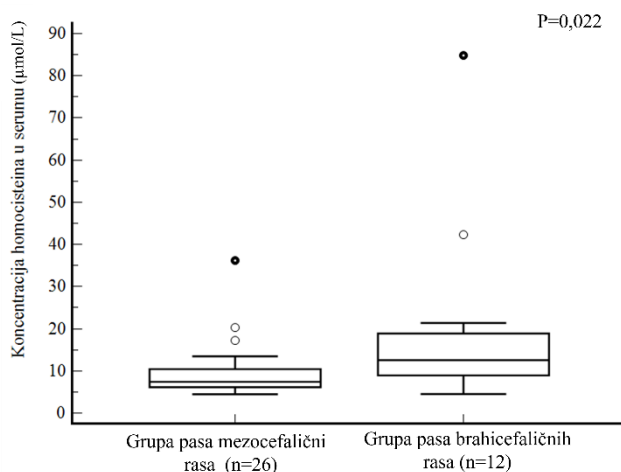


Figura 19. Poređenje homocisteina. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. *Mann-Whitney* U-test, $P < 0,05$ je značajna.

5.3. Korelacije pokazatelja sistemske inflamacije i homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom

5.3.1. Korelacije ispitane zajednički na svim grupama pasa uključenih u studiju sa atopijskim dermatitisom

Koncentracija serum amiloida A je korelirala jedino sa koncentracijom albumina (n=46, $P=0,006$). Korelacija je bila negativna, sa vrednošću koeficijenta korelacije (95% interval pouzdanosti) od -0,401 (-0,619 – -0,126).

Prisustvo atopijskog dermatitisa je bilo u pozitivnoj, a koncentracija holesterola u negativnoj korelaciji sa nivoom ceruloplazmina (Tabela 12). Multipla regresiona analiza potvrdila je da je prisustvo atopijskog dermatitisa nezavisni prediktor koncentracije ceruploazmina (koeficijent korelacije 0,462, koeficijent determinacije 0,213, $P=0,001$).

Tabela 12. Parametri koji su korelirali sa koncentracijom ceruloplazmina.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Atopijski dermatitis (ne/da) ⁶⁰	0,355 (0,112 – 0,559)	0,005
Holesterol (mmol/L) ⁵²	-0,334 (-0,556 – - 0,067)	0,015

** –*Spearman*-ova rank korelacija.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

Tabela 13 prikazuje da je aktivnost paraoksonaze bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom holesterola, a u negativnoj sa koncentracijom homocisteina. Primenom multiple regresione analize potvrđena je nezavisna povezanost aktivnosti paraoksonaze i koncentracije holesterola (koeficijent korelacije 0,515, koeficijent determinacije 0,265, P=0,001).

Tabela 13. Parametri koji su korelirali sa aktivnošću paraoksonaze 1.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Holesterol (mmol/L) ⁵²	0,350 (0,085 – 0,569)	0,011
Homocistein (μmol/L) ⁴⁴	-0,319 (-0,562 – -0,024)	0,035

** –*Spearman*-ova rank korelacija.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

Indeks akutne faze (SAA x CER)/(Albumin x PON1) je korelirao jedino sa prisustvom atopijskog dermatitisa (n=43, P=0,043). Korelacija je bila pozitivna, a vrednost koeficijenta korelacije (95% interval pouzdanosti) 0,311 (0,111–0,559).

Slično je uočeno i za koncentraciju homocisteina, budući da je korelirala samo sa aktivnošću paraoksonaze 1 (n=44, P=0,035). U pitanju je bile negativna korelacija sa koeficijentom korelacije (95% interval pouzdanosti) -0,319 (-0,562 – -0,024).

5.3.2. Korelacije ispitane na grupi pasa sa atopijskim dermatitisom

Koncentracija serum amiloida A je kod pasa sa atopijskim dermatitisom bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijama albumina i homocisteina (Tabela 14). Međutim, multipla logistička regresija nije potvrdila nezavisnu povezanost između pomenutih varijabli.

Tabela 14. Parametri koji su korelirali sa koncentracijom serum amiloida A.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Albumin (g/L) ³⁶	-0,406 (-0,648 – -0,090)	0,014
Homocistein (μmol/L) ³⁶	-0,394 (-0,640 – -0,076)	0,017

** –*Spearman*-ova rank korelacija.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

Negativna korelacija kod pasa sa atopijskim dermatitisom je postojala između koncentracije ceruloplazmina i koncentracije holesterola, odnosno relativne zastupljenosti HDL1 (eng. *high-density lipoproteins*) frakcije lipoproteina (Tabela 15). Primenom multiple regresione analize povezanost koncentracija ceruloplazmina i relativne zastupljenosti HDL1 je pokazana kao nezavisna (koeficijent

Tabela 15. Parametri koji su korelirali sa koncentracijom ceruloplazmina.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Holesterol (mmol/L) ³⁵	-0,269 (-0,552 – -0,007)	0,044
HDL1 ³⁴	-0,348 (-0,614 – -0,044)	0,044

** –*Spearman*-ova rank korelacija; HDL – eng. *high-density lipoproteins*.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

korelacije -0,364, koeficijent determinacije 0,132, P=0,034).

Među ispitivanim parametrima povezanost sa aktivnošću paraoksonaze 1 pokazala je jedino koncentracija apolipoproteina A1 (n=34, P=0,001). Korelacija je bila negativna, a korelacioni koeficijent (95% interval pouzdanosti) iznosio je -0,538 (-0,741 – -0,244).

Vrednosti indeksa akutne faze negativno su korelirale sa glikemijom, a pozitivno sa koncentracijom apolipoproteina A1 (Tabela 16). Korišćenjem multiple regresione analize povezanost sa koncentracijom apolipoproteinom A1 pokazala se kao nezavisna (koeficijent korelacije 0,446, koeficijent determinacije 0,199, P=0,009).

Tabela 16. Parametri koji su korelirali sa indeksom akutne faze.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Glukoza (mmol/L) ³³	-0,356 (-0,523 – -0,015)	0,042
Apolipoprotein A1 (g/L) ³³	0,489 (0,175 – 0,713) ³³	0,004

** –*Spearman*-ova rank korelacija; HDL – eng. *high-density lipoproteins*.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

Koncentracija homocisteina je bila u korelaciji sa dva parametra (Tabela 17). Pored već opisane negativne korelacije sa nivoom serum amiloida A, uočena je i pozitivna korelacija sa „podatkom“ da je pas sa atopijskim dermatitisom iz grupe brahicefaličnih rasa. Multiplom regresionom analizom utvrđeno je da pripadnost brahicefaličnoj rasi predstavlja nezavisni prediktor koncentracije homocisteina (koeficijent korelacije 0,392, koeficijent determinacije 0,154, P=0,018).

Tabela 17. Parametri koji su korelirali sa koncentracijom homocisteina.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Brahicefalična rasa (ne/da) ³⁸	0,374 (0,062 – 0,620)	0,021
Serum amiloid A ³⁶	-0,394 (-0,640 – -0,076)	0,017

** –*Spearman*-ova rank korelacija; HDL – eng. *high-density lipoproteins*.

Broj u superskriptu je broj analiziranih uzoraka.

5.4. Rezultati kod grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična inflamacija

5.4.1. Hematološki pokazatelji

Između zdravih i pasa sa dirofilariozom nije bilo razlike u hematološkim pokazateljima. Psi sa babeziozom su imali niži broj leukocita, neutrofila, limfocita i trombocita nego ostale grupe pasa. Takođe, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i hematokrit su u grupama pasa sa babeziozom i piometrom bili niži nego kod zdravih odnosno pasa sa dirofilariozom (Tabela 18).

Tabela 18. Poređenje broja eritrocita, koncentracije hemoglobina, vrednosti hematokrita, prosečne zapremine eritrocite (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)), prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (eng. *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC)), ukupnog broja leukocita i parametara diferencijalne leukocitarne formule i broja trombocita između zdravih pasa (ZP), pasa sa dirofilariozom (DIR), babeziozom (BAB) i piometrom (PIO). Broj ispitivanih uzoraka je u superskriptu.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	ZP	DIR	BAB	PIO	P
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	5,5–8,5	7,18 (5,7–7,9) ⁶	6,4 (3,4–8,1) ²¹	5,1 (1,6–9,1) ¹²	3,9 (3,5–5,7) ⁴	0,002*
Hemoglobin (g/L)	120–180	168 (106–188) ⁶	154 (90–204) ²¹	115 (51–207) ¹²	98 (70–140) ⁴	0,006*
Hematokrit (L/L)	0,37–0,55	0,41 (0,27–0,46) ⁶	0,39 (0,23–0,49) ²¹	0,31 (0,10–0,52) ¹²	0,26 (0,20–0,37) ⁴	0,010*
MCV (fL)	60–77	58 (48–59) ⁶	60 (54–71) ²¹	62 (49–68) ¹²	62 (57–74) ⁴	0,178
MCHC (g/L)	310–340	405 (387–408) ⁶	395 (344–426) ²¹	385 (355–495) ¹²	382 (330–442) ⁴	0,545
Leukociti ($\times 10^9/L$)	6–17	12,2 (8–15) ⁶	14 (7–26) ²¹	5 (3–35) ¹²	30 (7–80) ⁴	<0,001 [#]
Neutrofili ($\times 10^9/L$)	3–12	8,6 (5,6–12,4) ⁶	10 (6–19) ¹⁸	3 (0–28) ¹²	22 (5–73) ⁴	<0,001 [#]
Limfociti ($\times 10^9/L$)	1,0–4,8	2,5 (2,0–4,4) ⁶	2,3 (0,9–6,2) ¹⁸	0,9 (0,1–4,5) ¹²	3,3 (1,4–8,2) ⁴	0,013 [#]
Trombociti ($\times 10^9/L$)	200–500	393 (85–523) ⁶	258 (126–437) ²¹	0 (0–35) ¹²	227 (209–433) ⁴	<0,001 [#]

Vrednosti su prikazane kao medijana sa minimumom i maksimumom; *Kruskal-Wallis* test sa *post-hoc* analizom po *Conover*-u, $P < 0,05$ je značajna. Oznake za značajne razlike: * –BAB sa ZP i DIR, kao i PIO sa ZP i DIR; # –BAB sa ZP i DIR i PIO;

5.4.2. Biohemijski pokazatelji

Glikemija je bila najviša u grupi pasa sa babeziozom. Sve grupe pasa sa inflamacijom su imale nižu koncentraciju albumina nego zdravi psi, a među tim psima, oni sa babeziozom su imali najniže koncentracije ukupnih proteina i holesterola. Koncentracija alkalne fosfataze je bila viša u BAB i PIO grupama nego kod zdravih pasa i pasa sa dirofilariozom (Tabela 19).

Tabela 19. Poređenje koncentracije glukoze (GLU), uree, kreatinina, ukupnih proteina (TP), albumina, holesterola (HOL), triglicerida (TRIG), te zastupljenosti frakcija HDL (eng. *high-density lipoproteins*), TRL (eng. *triglyceride-rich lipoproteins*), nivoa alanin aminotransferaze (ALT), aspartat aminotransferaze (AST), alkalne fosfataze (ALP) i gama glutamil transferaze (GGT) između zdravih pasa (ZP), pasa sa dirofilariozom (DIR), babeziozom (BAB) i piometrom (PIO). Broj analiziranih uzoraka je u superskriptu.

Parametar (jedinice)	Referentni opseg	ZP	DIR	BAB	PIO	P
GLU (mmol/L)	3–6,7	3,1 (2,3–3,8) ⁶	4,0 (2,2– 6,7) ³¹	5,3 (4,5–7,6) ¹¹	4,2 (2,3–5,8) ⁸	0,001 [#]
Urea (mmol/L)	3,3–9,2	5,9 (2,3–12,4) ⁶	4,7 (1,3–32,4) ³¹	4,9 (3,1–18,4) ¹¹	2,8 (2,0–6,1) ⁷	0,149
Kreatinin (μmol/L)	50–169	58 (47–150) ⁶	66 (27–209) ³⁰	84 (53–240) ¹¹	56 (28–152) ⁷	0,442
TP (g/L)	55–80	60 (58–75) ⁶	63 (44–74) ³¹	54 (39–65) ¹¹	73 (46–76) ⁸	0,009 [‡]
Albumin (g/L)	25–40	31 (27–39) ⁶	27 (18–38) ³¹	26 (17–32) ¹¹	26 (18–29) ⁸	0,032 [*]
HOL (mmol/L)	2,5–6,5	4,3 (3,7–7,3) ⁶	5,4 (2,8–8,3) ²⁶	4,4 (2,5–5,9) ¹¹	6,3 (3,8–10,6) ⁸	0,031 [‡]
TRIG (mmol/L)	0,6–1,3	0,8 (0,5–2,0) ⁶	0,8 (0,3–1,3) ²⁶	0,9 (0,0–1,8) ¹¹	0,7 (0,4–1,3) ⁸	0,545
HDL ukupni	/	0,71 (0,38–0,79) ⁵	0,59 (0,16–0,87) ¹⁵	0,50 (0,42–0,58) ¹⁰	0,72 (0,57–0,80) ⁸	0,017 [□]
TRL	/	0,29 (0,21–0,62) ⁵	0,40 (0,12–0,84) ¹⁵	0,50 (0,42–0,58) ¹⁰	0,28 (0,20–0,43) ⁸	0,018 [□]
ALT (U/L)	10–50	36 (16–166) ⁶	46 (7–527) ²⁷	27 (11–101) ¹¹	13 (7–84) ⁸	0,276
AST (U/L)	10–58	27 (18–104) ⁶	28 (17–107) ³¹	34 (23–90) ¹¹	18 (7–27) ⁸	0,010 [‡]
ALP (U/L)	0–190	87 (31–178) ⁶	98 (27–701) ²⁸	282 (138– 411) ¹¹	203 (110–723) ⁸	<0,001 [*]
GGT (U/L)	0–7	6 (3–12) ⁶	7 (2–21) ²⁴	2 (2–8) ¹¹	3 (2–7) ⁴	0,006 ^Δ

Oznake za razlike: *–BAB sa ZP i DIR, kao i PIO sa ZP i DIR; #–BAB sa ZP i DIR i PIO; †–BAB sa DIR i PIO; *–ZP sa DIR i BAB i PIO; □–BAB sa ZP i PIO, kao i PIO sa. DIRO i BAB; ‡–PIO sa DIR i BAB; Δ–BAB sa. ZP i DIR. Vrednosti su prikazane kao medijana sa minimumom i maksimumom; *Kruskal-Wallis* test sa *post-hoc* analizom po *Conover*-u, $P < 0,05$ je značajna. Broj u superskriptu predstavlja broj analiziranih uzoraka, /–označava da ne postoji konsenzus oko referentnog opsega.

5.4.3. Pokazatelji sistemske inflamacije i homocistein

Psi sa babezozom su imali niže koncentracije homocisteina nego zdravi psi, dok su psi sa piometrom imali niže koncentracije homocisteina i od zdravih pasa i od pasa sa dirofilariozom. Nije ustanovljena razlika između zdravih pasa i pasa sa dirofilariozom, niti je postojala razlika između pasa sa dirofilariozom i pasa sa babezozom, kao ni između pasa sa babezozom i pasa sa piometrom (Figura 20A). Nivo SAA u grupama zdravih i pasa sa dirofilariozom je bio niži u poređenju sa grupama pasa sa babezozom i piometrom. Nije bilo razlike u koncentracije serum amiloida A između grupa zdravih pasa i pasa sa dirofilariozom, kao ni između pasa sa babezozom i piometrom (Figura 20B). Takođe, pokazana je jaka negativna korelacija između koncentracija homocisteina i serum amiloida A na celokupnom uzorku pasa (*Spearman*-ov koeficijent rank korelacije (95% interval pouzdanosti) = -0,502 (-0,690 – -0,251), $P < 0,001$).

Dodatna korelaciona analiza, pokazala je da je većina parametara koja je korelirala pozitivno ili negativno sa koncentracijom homocisteina istovremeno korelirala i sa koncentracijom serum amiloida A, ali je koncentracija bila suprotnog „smera“. Multipla regresiona analiza pokazala je da je koncentracija hemoglobina bile jedini nezavisni prediktor koncentracije homocisteina (koeficijent determinacije 0,094, $P = 0,012$) kada se ispitivane grupe posmatraju zajedno (Tabela 20).

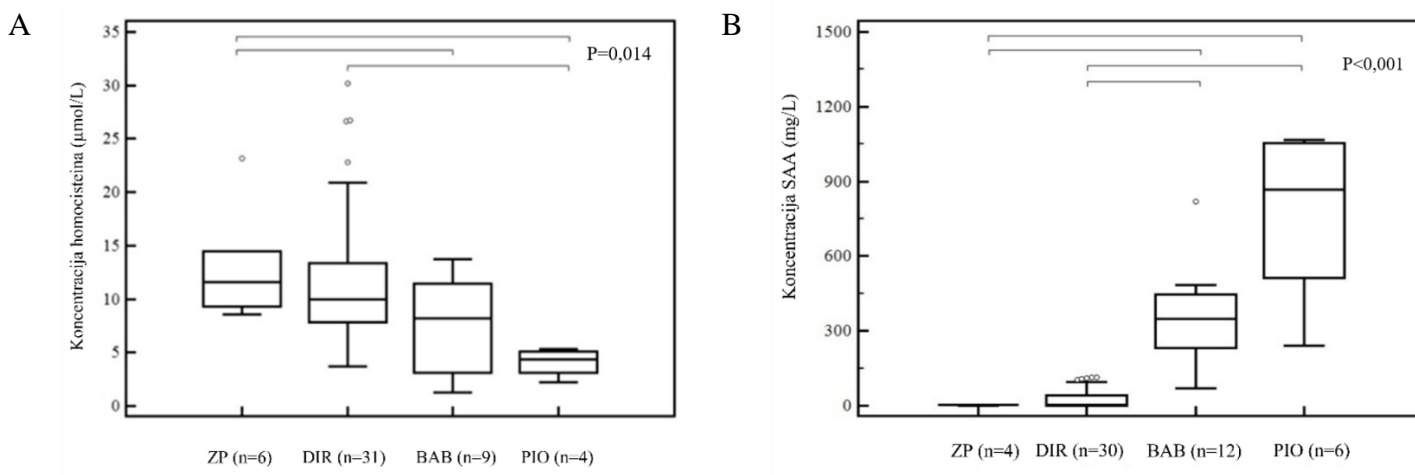


Figura 20. Koncentracija homocisteina (A) i SAA (B) kod grupe zdravih pasa (ZP), pasa sa dirofilariozom (DIR), pasa sa babezozom (BAB) i piometrom (PIO). Broj uzoraka je obeležen sa „n“. *Kruskal-Wallis* test, $P < 0,05$ značajna razlika. Konektori povezuju grupe kod kojih postoji razlika identifikovana *post-hoc* analizom po *Conover*-u. Pravougaonici predstavljaju razliku od nižeg ka višem kvartalu. Sredinija linija predstavlja medijanu, a vertikalna povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

Tabela 20. Korelacija između hematoloških i biohemijskih parametara (*Spearman*-ova rank korelacija, koeficijent korelacije (ρ_s), 95% interval pouzdanosti (CI)) sa homocisteinom i SAA kod ispitivanih pasa. Broj analiziranih uzoraka je napisan u superskriptu.

Parametar (jedinice)	Homocistein ($\mu\text{mol/L}$)		Serum amiloid A (mg/L)	
	ρ_s (95% CI)	P	ρ_s (95% CI)	P
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	0,542 (0,265 – 0,737) ³⁷	<0,001	-0,428 (-0,655 – -0,130) ³⁹	0,007
Hemoglobin (g/L)	0,494 (0,202 – 0,705) ³⁷	0,002	-0,382 (-0,622 – -0,075) ³⁹	0,016
Hematokrit (%)	0,432 (0,125 – 0,663) ³⁷	0,008	-0,340 (-0,592 – -0,028) ³⁹	0,033
MCHC (g/L)	0,470 (0,172 – 0,689) ³⁷	0,003	-0,332 (-0,586 – -0,018) ³⁹	0,039
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	0,395 (0,081 – 0,637) ³⁷	0,015	0,240 (-0,035 – 0,482) ⁵²	0,086
Neutrofili ($\times 10^9/\text{L}$)	0,392 (0,068 – 0,642) ³⁵	0,020	-0,374 (-0,623 – -0,057) ³⁷	0,022
Glukoza (mmol/L)	-0,442 (-0,643 – -0,183) ⁴⁹	0,001	0,426 (0,171 – 0,628) ⁵¹	0,002

Skraćenice: MCHC – (engl. *mean cellular hemoglobin concentration*) prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu.

5.5. Poređenje koncentracije pokazatelja akutne inflamacije odnosno homocisteina između grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična inflamacija

Koncentracija homocisteina se nije razlikovala između grupa pasa sa atopijskim dermatitisom, dirofilariozom i babezozom. Međutim, grupa pasa sa piometrom je imala nižu koncentraciju homocisteina u odnosu na ove tri grupe. Takođe, grupa pasa sa atopijskim dermatitisom i dirofilariozom se nisu razlikovale u koncentracijama serum amiloida A, koje su bile niže od vrednosti izmerenih u grupi pasa sa babezozom odnosno dirofilariozom (Tabela 21). Na uzorku koji sačinjavaju psi iz sve četiri grupe uočava se negativna korelacija između koncentracije homocisteina i serum amiloida A ($P < 0,001$), sa koeficijentom korelacije (95% interval pouzdanosti) od $-0,440$ ($-0,603 - -0,243$).

Tabela 21. Poređenje koncentracija homocisteina i serum amiloida A.

Grupa pasa sa:	Homocistein ($\mu\text{mol/L}$)	Serum amiloid A (mg/L)
Atopijskim dermatitisom	8,39 (4,49 – 84,75) ³⁸	7,97 (7,87 – 10,98) ³⁶
Dirofilariozom	9,89 (2,86 – 30,27) ³¹	2,79 (0,00 – 114,21) ³⁰
Babezozom	8,20 (1,27 – 13,75) ⁹	347,00 (71,00– 820,00) ^{12#}
Piometra	4,38 (2,19 – 5,33) ^{4*}	866,00 (242,00– 1066,83) ^{6#}
P	0,019	<0,001

Oznake za razlike: *–razlika u odnosu na grupe sa atopijskim dermatitisom, dirofilariozom i babezozom; #–razlika u odnosu na grupe sa atopijskim dermatitisom i dirofilariozom. Vrednosti su prikazane kao medijana sa minimumom i maksimumom; *Kruskal-Wallis* test sa *post-hoc* analizom po *Conover-u*, $P < 0,05$ je značajna. Broj u superskriptu predstavlja broj analiziranih uzoraka.

6. DISKUSIJA

Disertacija je uključila uzorak pasa sa atopijskim dermatitisom u remisiji, od kojih su uzorci krvi prikupljeni van sezone „polinacije”, pri čemu je terapija bila obustavljena u periodu od 10 dana do 12 nedelja, u zavisnosti od vrste i načina primene terapeutika. Većina rezultata je bila u okviru referentnih vrednosti, što je bilo u skladu sa kliničkim nalazima. Međutim, za pojedine parametre uočene su razlike kako između grupe zdravih i pasa sa atopijskim dermatitisom, tako i prilikom poređenja pasa brahicefaličnih i mezocefaličnih rasa unutar grupe pasa sa atopijskim dermatitisom. Premda su uočene razlike subkliničkog karaktera, imaju suštinski potencijal kao dopuna razumevanju do sada nedovoljno razjašnjenih aspekata patogeneze atopijskog dermatitisa (Koga i sar., 2021). Takođe, rezultati bi se u širem kontekstu mogli posmatrati i kao elementi metaboličko-inflamatornog fenotipa. Kao takvi bi mogli imati i praktičnu primenu prilikom praćenja promena koje kod obolelih životinja nastaju tokom lečenja i/ili uticaja različitih faktora poput starenja, sredinskih činilaca, promene mikrobioma kože, sekundarnih infekcija i slično (Marsella, 2021).

6.1. Anamnestičke, kliničke i demografske karakteristike grupe pasa sa atopijskim dermatitisom

Prema anamnestičkim podacima, pruritus je bio u izvesnoj meri zastupljen, no odsustvo vidljivih promena na koži je govorilo u prilog remisiji. Prethodna istraživanja navode da su tkivu kože kod pacijenata na terapiji, kao i u uzorcima bez lezija, prisutne promene koje ukazuju na supkliničku inflamaciju (Tang i sar., 2014). Kako je kod pacijenata bilo isključeno prisustvo komorbiditeta, sve pokazane razlike se sa zadovoljavajućom sigurnošću mogu pripisati atopijskom dermatitisu u remisiji.

Prilikom davanja odgovora na pitanje koje se rase odlikuju najvećom predispozicijom za nastanak atopijskog dermatitisa uočavaju se izražene razlike između regiona, pa i čitavih kontinenata (Jaeger i sar., 2010). Dermatološka ambulanta Nastavne bolnice za male životinje FVM UB je referentna ustanova za područje Beograda, pa i šire. U tom smislu, podaci o rasama među slučajevima atopijskog dermatitisa dijagnostikovanim tokom 2022. godine mogu se smatrati relevantnim podatkom za teritoriju Republike Srbije. Francuski buldog kao najzastupljenija rasa, ali i prisustvo mopsova i zapadnoškotskih terijera, u skladu su i sa podacima dobijenim na svetskom nivou (Mazrier i sar., 2016). Takođe, u skladu sa pomenutim podacima je i činjenica da je trećina pasa uključenih u studiju pripadala brahicefaličnim rasama. Interesantno je naglasiti da je u uzorku pasa sa atopijskim dermatitisom bilo duplo više mužjaka nego ženki, što nije u skladu sa prethodnim istraživanjima češće navode veću incidencu kod ženki (Couceiro i sar., 2020.; Herrmann i sar., 2017). Ipak, moguće je da bi se na većem uzorku pasa dobili drugačiji odnosi.

6.2. Hematološke i biohemijske karakteristike, i lipidni status pasa sa atopijskim dermatitisom

Hematološki parametri ukazuju da je atopijski dermatitis praćen supkliničkom inflamacijom na koju se nadovezuje blaga akutna stresna reakcija koja se drugačije ispoljava kod brahicefaličnih u odnosu na mezocefalične rase.

Psi sa atopijskim dermatitisom uključeni u ovo istraživanje su imali veći broj eritrocita, višu hematokritsku vrednost i veći stepen anizocitoze u odnosu na kontrolne pse. Blaga policitemija može biti posledica hipoksemije i hipoksije koje mogu nastati usled teškog opstruktivnog sindroma respiratornih puteva brahicefaličnih pasa, ili kao posledica blage dehidracije koja bi se mogla pripisati većem stepenu stresa kod pasa sa atopijskim dermatitisom koji dovodi do tahipnoje i ispravanja vode sa sluznice respiratornih puteva, odnosno dovodi do hemokoncentracije (Crane i sar., 2017). Pacijenti sa atopijskim dermatitisom najverovatnije imaju niži prag za stresnu reakciju i moguće je da dolazak kod veterinaru izaziva tahipnoju. Poređenjem rezultata brahicefaličnih i mezocefaličnih rasa je uočeno da je

blaga policitemija zapravo bila prisutna kod mezocefaličnih rasa te je moguće pretpostaviti da je tahipnoja kod njih bila izrazitija i da je iz disajnih puteva isparavanje bilo obilatije.

Stepen anizocitoze se nije razlikovao između brahicefaličnih i mezocefaličnih pacijenata, ali su njegove vrednosti, iako u okviru fizioloških, bile značajno više kod pasa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolne pse. Osim toga, ostali hematološki indeksi nisu bili promenjeni niti su se razlikovali između grupa. Iako se porast stepena anizocitoze, kod ljudi i kod pasa povezuje sa sistemskom supkliničkom inflamacijom i oksidativnim stresom (Marzouk i sar., 2020; Mohamed i sar., 2020; Miglio i sar., 2023), čini se da je u ovoj studiji ta promena suptilna. Ipak, ne treba izgubiti iz vida da u hroničnim patološkim stanjima brojni kompenzatorni mehanizmi obezbeđuju uslove u kojima se uspostavlja ravnoteža na jednom višem nivou koji u ovom konkretnom slučaju obezbeđuje istovetnu koncentraciju hemoglobina između ispitivanih grupa, ali utiče na izraženiji stepen anizocitoze.

Ujednačen broj leukocita između ispitivanih grupa svakako ukazuje da ni jedna životinja nije imala akutnu inflamaciju. Jedina razlika u broju leukocita se odnosila na duplo veći broj eozinofila kod pasa sa atopijskim dermatitisom, iako je ukupan broj ove vrste leukocita bio u okviru referentnih vrednosti. Eozinofilija je opisana kod ljudi (Simon i sar., 2004), ali se ne navodi toliko često kod pasa sa atopijskim dermatitisom (Lilliehöök i sar., 2000; Michál'ová i sar., 2022). Moguće je da razlog ovakve situacije zapravo leži u referentnim vrednostima koje su kod pasa ($0,1-1,2 \times 10^9/L$ – Procyte, IDEXX, IDEXX Lab.) „šire“ nego kod ljudi ($\leq 0,45 \times 10^9/L$) (Hatton i sar., 2020). Uzrok tih „širih“ referentnih vrednosti je izvesno veći broj preanalitičkih varijabli kod pasa koje nije lako kontrolisati. Zbog toga bi se moglo smatrati da je veći broj eozinofila uočen kod pasa sa atopijskim dermatitisom upravo pokazatelj sistemske reakcije koja nastaje oslobađanjem odgovarajućih citokina sa endokrinim delovanjem u sklopu reakcije I prvog tipa preosetljivosti. Dalje ispitivanje pasa sa atopijskim dermatitisom je takođe pokazalo da brahicefalični psi imaju veći broj neutrofilnih granulocita u odnosu na mezocefalične što bi moglo da ukaže na nešto veći stepen stresa, odnosno lučenje adrenalina kao medijatora koji dovodi do oslobađanja neutrofila iz marginalne populacije leukocita. Ako su atopijski dermatitis, kao i opstrukcija gornjih vazdušnih puteva kod brahicefaličnih pasa stanja koje dovode do razvoja određenog stepena stresa, moguće je pretpostaviti da je dolazak u ambijent veterinarske ambulante dodatno psihogeno opterećenje za ove pacijente i da ono dovodi do razlike u broju neutrofila između brahicefaličnih i mezocefaličnih pasa. U pojedinim prethodnim studijama je zabeleženo da brahicefalični psi imaju veći broj neutrofila u odnosu na mezocefalične pse (Facin i sar., 2020), pa se može pretpostaviti da je niži prag stresa konstantna promena vezana za ovaj fenotip psa.

Broj trombocita se nije razlikovao, ali je prosečna zapremina trombocita bila veća kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na zdrave kontrole. Takođe, brahicefalični psi su imali 30–70% veći broj trombocita u odnosu na mezocefalične pse bez razlike u prosečnoj zapremini trombocita što ukazuje da je povećanje dijametra trombocita karakteristika atopijskog dermatitisa nezavisna od toga da li pas pripada brahicefaličnoj ili mezocefaličnoj rasi. Ranije je opisana korelacija između prosečne zapremine trombocita i jačine kliničke slike atopijskog dermatitisa kod dece (Bostan Gayret i sar., 2019), dok kod pasa, do sada, nisu prijavljene ovakve promene (Majewska i sar., 2016). Veličina trombocita korelira sa brzinom njihovog stvaranja, te se porast zapremine trombocita očekuje kada citokini, na prvom mestu interleukin 6, aktiviraju megakariocite (Korniluk i sar., 2019). Stvaranje trombocita je afektirano i kod brahicefaličnih i kod mezocefaličnih pasa, i najverovatnije se može pripisati hroničnoj supkliničkoj inflamaciji. Citokini koji deluju na trombopoezu pripadaju citokinima grupe 2 koji stimulišu sintezu C-reaktivnog proteina i fibrinogena koji u ovoj studiji nisu ispitivani. Razlika u u broju trombocita bi mogla biti karakteristika brahicefaličnih pasa koja je i ranije opisana (Erjavec & Svete, 2023). Mogla bi se pripisati 1) većem broju megakariocita i/ili sporijem uklanjanju

trombocita kod brahicefaličnih pasa, 2) bržem uklanjanju trombocita kod mezocefaličnih rasa. Brzina uklanjanja trombocita se može povezati sa građom i fizičkim karakteristikama jetre i slezine za koje je pokazano da kod brahicefaličnih rasa nisu podjednako elastične kao kod mezocefaličnih rasa (Facin i sar., 2020).

Biohemijski parametri ukazuju da je atopijski dermatitis praćen supkliničkom inflamacijom na koju se nadovezuju blaga akutna stresna reakcija i blaga dislipidemija.

Koncentracija ukupnih proteina i globulina je bila veća, dok je odnos albumin/globulin bio manji kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolne pse što je ukazivalo na postojanje hronične sistemske supkliničke inflamacije. U sastav globulina ulaze alfa-, beta- i gama-globulini. U alfa- i beta-globuline spadaju proteini akutne faze od kojih su u ovoj studiji određeni serum amiloid A i ceruloplazmin. Koncentracija serum amiloida A se nije razlikovala između ispitivanih grupa, dok je koncentracija ceruloplazmina bila veća kod pasa sa atopijskim dermatitisom. U gama-globuline spadaju različite klase imunoglobulina. Iako je IgE nepobitni medijator I tipa preosetljivosti, on se često ne može detektovati kod pasa sa atopijskim dermatitisom (Lauber i sar., 2012; Pucheu-Haston i sar, 2015), a ponekada se u serumu nalaze i niže koncentracije nego kod zdravih pasa (Hill i sar., 1995) što bi se eventualno moglo objasniti njihovim sesilnim položajem na membrani mastocita. Koncentracija IgA je takođe često niža kod pasa sa atopijskim dermatitisom što se smatra faktorom rizika za njegovo nastajanje jer je to jedan od uzroka smanjene imunske zaštite kože i sluznica (Hill i sar., 1995). Međutim, interesantno je da se kod pasa sa atopijskim dermatitisom mogu izmeriti veće koncentracije alergena specifičnih IgG antitela (Hill i sar., 1995). Porast IgG i porast ceruloplazmina, i moguće drugih proteina akutne faze, bi mogao biti razlog porasta koncentracije globulina među ispitivanim pacijentima. Suprotno u odnosu na rezultate ove studije, neki autori opisuju hipoproteinemiju kod pacijenata sa atopijskim dermatitisom, kako kod ljudi (Jo i sar., 2018; Nomura i sar., 2002) tako i pasa (Dulman i sar., 2015). Ta razlika se može objasniti različitim stadijumima bolesti: pacijenti u ovoj studiji su imali promene niskog intenziteta i uzorkovanje je vršeno kada je izloženost alergenima bila najniža, dok su ostale studije rađene na uzorcima pacijenta sa izraženom kliničkom slikom atopijskog dermatitisa koja je možda bila praćena i drugim komorbiditetima. Vrednosti za ukupne proteine i globuline se nisu razlikovale između brahicefaličnih i mezocefaličnih pasa te se može smatrati da je ovo jedinstvena karakteristika pasa sa blagom formom atopijskog dermatitisa.

Viša koncentracija glukoze koja je zapažena kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolne pse se može objasniti akutnom stresnom reakcijom (Baum i Porte, 1980). Slični podaci za pse do sada nisu objavljeni, ali je poznato da deca obolela od atopijskog dermatitisa imaju višu glikemiju nego ona koja su se smatrala zdravim (Mohamed i sar., 2021). U budućim studijama bi bilo interesantno uporediti koncentracije fruktozamina i na taj način proveriti da li se radi samo o akutnom povišenju glikemije ili je u pitanju hroničan poremećaj.

Psi sa atopijskim dermatitisom su imali niže vrednosti alkalne fosfataze i γ -glutamil sintetaze u odnosu na kontrolne pse dok se te vrednosti nisu razlikovale između brahicefaličnih i mezocefaličnih rasa pasa. Oba enzima su pokazatelji aktivnosti koja je vezana za integritet membrane žučnih kanalića i eventualnu holestazu kada su u pitanju visoke vrednosti oba enzima. U ovoj studiji se aktivnost ova dva enzima ne može povezati sa promenama na hepatobilijarnom sistemu. Interesantno je da alkalna fosfataza kod pasa ima tri izoforme od kojih je kortikosteroidima indukovana najčešće povećana. Kako u ovoj studiji nisu određivane izoforme alkalne fosfataze, može se samo pretpostaviti da kod pasa sa atopijskim dermatitisom, udeo jetrene i kortikosteroidima indukovane izoforme nije podjednak.

Patogeneza atopijskog dermatitisa se jednim delom zasniva na poremećaju građe i funkcije epidermalne barijere, i to na prvom mestu smanjena koncentracija ceramida, holesterola i masnih kiselina, a povećanja fosfolipida (Popa i sar., 2012). Takođe je izvesno da metabolizam lipida u koži nije nezavistan od sistemskih promena i da interakcija lipoproteina plazme i ćelija epidermisa postoji (Feingold, 2007; Nikkari i sar., 1975). Ipak promene u lipidnom profilu seruma kod pasa sa atopijskim dermatitisom nisu opisane (Fuhrmann i sar., 2006; Sævik i sar., 2002), mada analiza lipoproteinskih frakcija kod tih pacijenata do sada nije ispitivana. Brahicefalični i mezocafalični psi koji su bili pacijenti u ovoj studiji su imali nešto nižu koncentraciju holesterola u serumu kao i manju zastupljenost HDL1 frakcije nego kontrolni psi. Holesterol je kod većine pasa bio u okviru referentnih vrednosti, mada se može uočiti da je određeni broj pasa u kontrolnoj grupi imao vrednosti koje su bile iznad referentnih. Ova razlika u koncentraciji holesterola bi se mogla objasniti kontrolisanom, komercijalnom dijetetskom ishranom kod pasa sa atopijskim dermatitisom koja čini deo terapijske procedure, i nedovoljno kontrolisanom ishranom kod pasa koji su bili u kontrolnoj grupi. Sa druge strane, manja zastupljenost HDL1 frakcije ukazuje da je kod pasa sa atopijskim dermatitisom prisutna dislipidemija. Naša prethodna istraživanja pokazuju da se posle 12, 24 i 36 časova gladovanja, kod pasa sa normalnom telesnom kondicijom smanjuje HDL1 frakcija, dok HDL2 i dalje ostaje elektroforetski jasno prepoznatljiva (Dedać-Delkić i sar., 2018). Suprotno, tokom akutne inflamacije koja je praćena i gubitkom apetita, dolazi do promene morfologije HDL1 i HDL2, odnosno, gubi jasna distinkcija između ove dve frakcije, HDL2 postaje neprepoznatljiv, a ukupna HDL frakcija se karakteriše većim dijametrom (Milanović i sar., 2019). Kod specifičnog soja miševa kod kojih je eksperimentalno izazvan atopijski dermatitis, pokazano je da su u jetri smanjena ekspresija iRNK za enzime koji učestvuju u beta-oksidaciji masnih kiselina, dok drugi biohemijski putevi vezani za metabolizam lipida nisu bili promenjeni (Seino i sar., 2012). Međutim, atopijski dermatitis nije jedino stanje koje indukuje smanjenje obima beta-oksidacije masnih kiselina u hepatocitima. Tako je pokazano da i inflamacija u svom akutnom obliku može smanjiti (Van Wyngene i sar., 2018) ali i povećati beta-oksidaciju masnih kiselina (Fujieda i sar., 2013). Ukoliko se prihvati pojednostavljena interpretacija da je HDL2 akceptor holesterola u tkivima u koje spada i koža, i da se on u cirkulaciji transformiše u HDL1 koji ima ulogu da višak holesterola i lipida preda hepatocitima, mogu se postaviti dve mogućnosti. Naime, moguće je da je reverzni transport holesterola iz tkiva „usporen“, dok je predavanje holesterola hepatocitima u okviru fizioloških vrednosti, te da se HDL1 čestice zapravo ne stvaraju u dovoljnoj meri. Druga mogućnost bi bila da se višak holesterola u zadovoljavajućem ili možda čak povećanom obimu predaje HDL2 česticama, ali da hepatociti takođe u povećanom obimu preuzimaju holesterol i masne kiseline sa HDL1 čestica, s obzirom na poremećaje u beta-oksidaciji masnih kiselina čija patogeneza može ležati u samom atopijskom dermatitisu (Seino i sar., 2012) ili indirektno u efektima eventualno prisutne supkliničke inflamacije.

Nalaz manje zastupljenosti HDL1 frakcije kod obolelih pasa može biti u skladu sa rezultatima dobijenim kod dece koja boluju od atopijskog dermatitisa gde autori prijavljuju, pored više koncentracije holesterola i triglicerida, nižu koncentraciju HDL frakcije (Kim i sar., 2020)

U sklopu navedenih rezultata ispitivanja lipidnog profila uočava se da odsustvo razlike u koncentraciji apolipoproteina A1 kako između zdravih i pasa sa atopijskim dermatitisom, tako i između obolelih pasa u zavisnosti da li pripadaju brahicefaličnim ili mezocefaličnim rasama. Literaturni podaci najčešće navode snižene vrednosti ovog apolipoproteina u stanjima jake sistemske inflamacije, mada postoje i izuzeci, kao što je babezioza gde su promene suprotnog smera (Milanović i sar., 2019). Obzirom na odsustvo jake sistemske inflamacije kod ispitivane grupe pasa sa atopijskim dermatitisom izostanak razlike u nivou apolipoproteina A1 između nje i grupe kontrolnih pasa ne iznenađuje.

6.3. Pokazatelji sistemske inflamacije

Rezultati studije ne daju konzistentan odgovor na pitanje da li je kod ispitivane grupe pasa sa atopijskim dermatitisom prisutna sistemska inflamacija. Prilikom tumačenja neophodno ih je sagledati sa dva stanovišta. Jedno od njih proističe iz činjenice da su u trenutku prikupljanja uzoraka kod pasa nije bilo promena na koži koje bi se mogle povezati sa atopijskim dermatitisom i/ili njegovim komplikacijama. U tom smislu značajno je i da psi nisu dobijali terapiju u određenom vremenskom periodu čime su na najmanji nivo svedeneni eventualni jatrogeni efekti. Drugo stanovište se zasniva na specifičnim ulogama i dinamici koji svaki od ispitivanih proteina ima tokom reakcije akutne faze (Cray, 2012). Na ovaj način dobijeni rezultati mogu pružiti pouzdane informacije o „bazalnim“ nivoima pokazatelja sistemske inflamacije kod pasa sa atopijskim dermatitisom, koji bi bili neophodni za precizniju i potpuniju procenu sistemskih efekata inflamacije tokom pogoršanja odnosno primene terapije. Kao dopunu ovim stanovištima neophodno je naglasiti da ni kod jednog od ispitivanih pokazatelja sistemske inflamacije nisu postojale razlike u zavisnosti da li je pas sa atopijskim dermatitisom pripadao brahicefaličnoj ili mezocefaličnoj rasi.

6.3.1. Serum amiloid A

Koncentracija serum amiloida A u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom nije se razlikovala od koncentracije u kontrolnoj grupi. Sa druge strane, pomenuta koncentracija je bila nekoliko desetina odnosno nekoliko stotina puta niža u od nivoa kod pasa sa babeziozom odnosno piometrom. Posmatrana zajedno sa podacima dobijenim kliničkim pregledom pasa, ovakva poređenja isključuju prisustvo jake akutne sistemske inflamacije kod ispitivane grupe pasa sa atopijskim dermatitisom. Dodatno, koncentracije serum amiloida A kod pasa sa atopijskim dermatitisom u ovoj studiji bile su i nedvosmisleno niže u odnosu na vrednosti dobijene kod pasa sa asimptomatskom infekcijom sa *Babesia canis* (Milanović i sar., 2020), što je isključilo i postojanje subkliničke akutne inflamacije.

Razmatranje rezultata za SAA kod pasa sa atopijskim dermatitisom u smislu prisustva hronične sistemske inflamacije je nešto složenije. Vrednosti su manje u poređenju sa nivoima kod pasa sa umerenom formom lajšmanioze (Antić i sar., 2022), što sa velikom verovatnoćom isključuje prisustvo hronične inflamacije umerenog intenziteta. Međutim, činjenica da se rezultati nisu razlikovali između grupa pasa sa atopijskim dermatitisom i dirofilariozom, koju su većinom sačinjavale asimptomatske životinje, može ukazivati na prisustvo subkliničke hronične sistemske inflamacije. U ovom smislu bi se mogla protumačiti i negativna korelacija između koncentracija serum amiloida A i albumina, budući da je prvi pozitivan, a drugi negativni reaktant akutne faze (Cray, 2012). Ovakva razmatranja dodatno potkrepljuju i podaci o ekspresiji gena za SAA u uzorcima kože kod pasa sa atopijskim dermatitisom (Wood i sar., 2009). Iako nije bilo razlike u relativnoj ekspresiji između grupe uzoraka kože zdravih pasa i grupe uzoraka kože pasa sa atopijskim dermatitisom (sa i bez patoloških promena), ustanovljena je pozitivna korelacija između ekspresije gena za serum amiloid A u uzorcima kože bez patoloških promena i broja pozitivnih reakcija prilikom intradermalnog testiranja odnosno vrednosti *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index-a*.

Rezultati dobijeni za serum amiloid A u disertaciji saglasni su sa literaturnim podacima za C-reaktivni protein, koji takođe predstavlja “brzi” reaktant akutne faze kod pasa (Ceron i sar., 2005). Studija Favrot-a i saradnika (2021) pokazala je da koncentracija C reaktivnog proteina, iako ne pokazuje razliku između zdravih i pasa sa atopijskim dermatitisom, korelira sa *Canine Atopic*

Dermatitis Extent and Severity Index-om. Posmatrano integrativno, rezultati disertacije zajedno sa literaturnim podacima (Almela i Ansón, 2015; Favrot i sar., 2021; Malin i Witkowska-Piłaszewicz, 2022) ukazuju da određivanje koncentracije “brzih” reaktanata akutne faze ne pokazuje dijagnostički potencijal za atopijski dermatitis. Sa druge strane, ovakvi rezultati bi mogli usmeravati buduća istraživanja na “brze” reaktant akutne faze kao pokazatelje egzacerbacije ili pojave komplikacija atopijskog dermatitisa.

6.3.2. Ceruloplazmin

Nivo ceruloplazmina je bio viši u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom nego u kontrolnoj grupi. Sa druge strane, opseg u kome su se nalazile koncentracije bio je znatno ispod raspona vrednosti izmerenih kod pasa u trenutku kada im je dijagnostikovana babezioza (Spariosu i sar., 2021), oboljenje za koje je karakteristična jaka akutna inflamacija (Beletić i sar., 2021). Dodatno, vrednosti su bile niže i od onih koje se, prema literaturnim navodima, mogu naći kod pasa sa umerenom formom lajšmanioze, oboljenja u kome je prisutna umerena hronična inflamacija (Antić i sar., 2022). Poređenjem sa referentnim intervalom uočava se da je kod skoro polovine pasa sa atopijskim dermatitisom vrednost bila povećana. Međutim, pri tome je neophodno naglasiti da je povećanje bilo izuzetno umereno, jer nijedna koncentracija nije za više od 50% prevazilazila gornju granicu referentnog intervala. Ovakvi nivoi ceruloplazmina, kao umerenog reaktanta akutne faze kod pasa (Ceron i sar., 2005), ukazuju na prisustvo subkliničke hronične sistemske inflamacije u ispitivanoj grupi pasa sa atopijskim dermatitisom.

Podaci o povišenim vrednostima ceruloplazmina kod pasa sa dermatološkom patologijom su dostupni u literaturi. *Ulutaş* i saradnici (2007) opisali su veće vrednosti kod grupe uopšteno opisane kao psi sa “različitim” kožnim problemima. Arslan i Kirmizigül (2020) su prijavili visoke vrednosti ceruloplazmina kao deo odgovora akutne faze kod sarkoptes šuge, međutim studija *Dinler Ay* i saradnika (2022) nije potvrdila ovakve rezultate. Značaj veće koncentracije ceruloplazmina kao dokaza subkliničke hronične inflamacije kod pasa sa atopijskim dermatitisom, što predstavlja jedan od rezultata disertacije, proizilazi iz toga što su razlike dobijene između precizno formirane grupe obolelih pasa u remisiji i grupe zdravih pasa. Osim toga, ovaj rezultat otvara i mogućnost komparativnog tumačenja sa studijama koje su kod ljudi istraživale ulogu ceruloplazmina kod atopijskih stanja. Kod grupe odraslih bolesnika mlađe životne dobi nađene su niže koncentracije u odnosu na zdrave osobe iste starosti, pri čemu su dodatna poređenja ukazala na izraženije niže koncentracije kod bolesnika koji su imali težak oblika atopijskog dermatitisa (Bae i Kim, 2022). Žene se alergijskim rinitisom imale su više koncentracije ceruloplazmina u odnosu na zdrave, a dodatno se značajnim čini i podatak da je porast koncentracije bio povezan sa izloženošću faktorima koji su delovali iritirajuće na nosnu sluznicu (Petje i sar., 2021). U ovakvom kontekstu, rezultati disertacije potkrepljuju značaj istraživanja o (pato)biološkim specifičnostima uloga koje ceruloplazmin ima kod različitih organizama.

Kada je posmatran celokupni uzorak pasa u disertaciji, prisustvo atopijskog dermatitisa pokazalo se kao nezavisni prediktor koncentracije ceruloplazmina. Ovakav podatak bi mogao ukazivati na ulogu ceruloplazmina kao antioksidansa, ali i u procesu remodelovanja tkiva kože budući da ceruloplazmin transportuje jone bakra, neophodne za zarastanje ozleda odnosno formiranje i sazrevanje kolagena (Ceron i sar., 2005). Osim toga, u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom postojala je nezavisna povezanost koncentracije ceruloplazmina i relativne zastupljenost HDL1 (eng. *high density lipoprotein*) frakcije. Negativna priroda korelacije, posmatrana sa podacima o strukturnoj i molekularnoj dislipidemiji u okviru atopijskog dermatitisa (Marsella, 2021) čini relevantnom i pretpostavku o specifičnim ulogama ceruloplazmina u patogenezi, zahvaljujući njegovoj povezanosti sa apoptozom, citotoksičnošću i regulacijom genske ekspresije (Bae i Kim, 2022).

6.3.3. Paraoksonaza 1

Rezultati disertacije nisu pokazali da između pasa sa atopijskim dermatitisom i zdravih pasa postoji razlika u aktivnosti paraoksonaze 1. Takođe, opseg izmerenih vrednosti je najvećim delom bio iznad opsega koji se u literature može pronaći za pse kod kojih je prisutna akutna ili hronična sistemska inflamacija (Spariosu i sar., 2021; Antić i sar., 2022). Takođe, svega nekoliko rezultata u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom je bilo ispod donje granice referentnog intervala. Obzirom da paraoksonaza pripada grupi negativnih reaktanata akutne faze kod pasa (Carretón i sar., 2017), ovakvi rezultati ne mogu potvrditi prisustvo bilo kakvog oblika sistemske inflamacije.

U molekularnom patofiziološkom kontekstu aktivnost paraoksonaze 1 se smatra anti-oksidativnim i anti-inflamatornim činiocem. Shodno tome, nedavna studija je njen smanjen nivo razmatrala kao pokazatelj oksidativnog stresa u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom (Almela i sar., 2018). Direktno poređenje sa rezultatima disertacije je otežano iz dva razloga. Prvi je da ispitivana grupa pasa u studiji iz literature nije bila homogena, u smislu da su autori među 12 ispitivanih pasa uključili čak tri sa “hranom-indukovanim atopijskim dermatitisom”. Drugi razlog leži u činjenici da je većina pasa imala blagi atopijski dermatitis, sudeći po vrednosti *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index*-a (Almela i sar., 2018; Olivry i sar., 2014.). Kod pasa u disertaciji je nutritivna alergija bila isključena, a klinički pregled je ukazivao na remisiju što otvara prostor za dalja, prospektivna dizajnirana istraživanja o značaju promena u aktivnosti paraoksonaze 1 u praćenju kliničkog toka atopijskog dermatitisa.

Negativna korelacija između aktivnosti paraoksonaze 1 i koncentracije homocisteina, prisutna na celokupnom uzorku pasa u disertaciji se mogla smatrati i očekivanom, budući da je za “utrošak” izvesne količine aktivnosti neophodan za razgradnju homocistein-tionolaktone, derivata koji se smatra ključnim u mehanizmima štetnog delovanja homocisteina (Perla-Kaján J i Jakubowski, 2012). Sa druge strane, nezavisna pozitivna povezanost aktivnosti paraoksonaze sa koncentracijom holesterola na istom uzorku, odnosno nezavisna negativna sa koncentracijom apolipoproteina A1 u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom, zavređuju dodatna istraživanja u smislu značaja disfunkcionalnog HDL (eng. *high density lipoprotein*) (De Simoni i sar., 2022) kao elementa dislipoproteinemije kod atopijskog dermatitisa.

6.3.4. Indeks akutne faze

Pojam indeks akutne faze nastao je ako rezultat nastojanja da se optimizuje dijagnostički i prognostički značaj određivanja proteina akutne faze. Kako bi se prevazišla ograničenja vezana za njihovu specifičnost, ali i iskoristile razlike u njihovoj dinamici i funkcijama tokom reakcije akutne faze, predloženo je da se izračunava indeks akutne faze tako što će se odnos proizvoda koncentracija “brzog i sporog” pozitivnog reaktanta akutne faze podeliti sa proizvodom njihovih analoga među negativnim reaktantima akutne faze (Gruysi sar., 2006)

Indeks akutne faze u disertaciji je kombinovao serum amiloid A i ceruloplazmin kao pozitivne, odnosno albumin i paraoksonazu kao negativne (Ceron i sar., 2005; Carretón i sar., 2017). Vrednosti indeksa su bile veće kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrole i nisu se razlikovale u zavisnosti da li su psi pripadali mezocefaličnim ili brahicefaličnim rasama. Ovakvi rezultati su dali dodatan, integrativan dokaz o postojanju subkliničke hronične sistemske inflamacije kod ispitivane grupe pasa sa atopijskim dermatitisom. Takođe, i nezavisna pozitivna korelacija između indeksa akutne

faze i koncentracije apolipoproteina A1 govori u prilog povezanosti subkliničke hronične inflamacije i dislipoproteinemije kod pasa sa atopijskim dermatitisom uključenih u ovo istraživanje.

6.4. Homocistein

6.4.1. Homocistein kod pasa sa atopijskim dermatitisom

Rezultati ispitivanja koncentracije homocisteina su takođe pokazali specifičnosti koje u izvesnoj meri nisu potvrdile početnu pretpostavku o hiperhomocisteinemiji kod pasa sa atopijskim dermatitisom. Naime, kada se posmatra celokupni uzorak pasa u disertaciji, nije bilo razlike u koncentraciji homocisteina koje bi poticale od toga da li je pas pripadao grupi obolelih ili zdravih životinja. Međutim, u okviru grupe sa atopijskim dermatitisom uočene su razlike u smislu da su psi koji su pripadali brahicefalničnim rasama imali višu koncentraciju homocisteina u odnosu na pse mezocefalinih rasa.

Studija japanskih istraživača ukazala je na višu koncentraciju koncentraciju homocisteina kod pasa sa kožnim bolestima (Kakimoto i sar., 2014). Činjenica da rezultati disertacije nisu bili u skladu sa navedenim podatkom može se najjednostavnije objasniti razlikama u eksperimentalnom dizajnu između ova dva istraživanja. Naime, kako japanski istraživači navode, prilikom selekcije pasa nisu imali precizne kriterijume za diferencijalnu dijagnostiku oboljenja kože, te su neki od pasa uključeni i samo na osnovu anamnestičkih podataka, a bez jasnih znakova dermatitisa, bez obzira na njegovu etiologiju. Takođe, u pomenutoj studiji su psi sa kožnim bolestima bili 2–3 puta stariji u odnosu na grupu pasa sa atopijskim dermatitisom u disertaciji. Dodatno, u članku japanskih autora se nisu mogli pronaći dodatni klinički i laboratorijski podaci koji bi isključili eventualno prisustvo stanja koja mogu uticati na nivo homocisteina. Nisu za zanemarivanje ni činjenice da grafički prikazi distribucije koncentracija homocisteina ukazuju na manju varijaciju unutar grupa u disertaciji u odnosu na studiju japanskih istraživača, odnosno da je razlika u broju pasa u grupama zdravih i obolelih životinja bila višestruko manja u disertaciji.

Obzirom na metaboličku povezanost homocisteina i metionina (Blom i Smulders, 2011), potencijalno objašnjenje ovakvih rezultata bi mogle ponuditi studije o povezanosti atopijskog dermatitisa i promena u metabolizmu kože kod ljudi (Ilves i sar., 2021), odnosno seruma kod eksperimentalnih miševa (Koga i sar., 2021). Kod ljudi obolelih od atopijskog dermatitisa, koncentracija metionina bila je veća u uzorcima kože sa lezijama u odnosu na uzorke bez lezija, kao i na uzorke kože zdravih osoba. Autori su rezultate povezali sa eventualnom inhibicijom enzima adenzil-metionin dekarboksilaze, neophodne za korišćenje metioninskih metabolita za međusobnu konverziju biogenih amina, tačnije putrescina u spermidina i spermin, što bi imalo uticalo na lokalnu ravnotežu pro- i anti-inflamatornih činilaca (Ilves i sar., 2021). No, pitanje uticaja ravnoteže između pomenutih biogenih amina na lokalni inflamatorni odgovor zahteva daleko šire sagledavanje tj. kombinovanje sa kliničkim i anamnestičkim podacima, budući da postoje podaci da je u tkivu na rubovima pruritičnih lezija povećana ekspresija gena za adenzil-metionin dekarboksilazu (Lim i sar., 2018). Pretpostavke o povezanosti metabolizma metionina i patogeneze nastanka odnosno progresije atopijskog dermatitisa na specifičan način potvrđuju i rezultati dobijeni u serumu kod miševa. Koncentracija metionina u serumu je bila u negativnoj korelaciji sa pokazateljima dermatoloških oštećenja, pri čemu korelacija nije zavisila od unosa metionina hranom. Ovakvi podaci su dali osnova za hipotezu da je smanjenje nivoa metionina u serumu uzrokovano njegovim povećanim preuzimanjem u tkivo, konkretno kožu u ovom slučaju, u kome bi se moglo očekivati da metionin uspori mehanizme odgovore za nastanak atopijskog dermatitisa. Takođe, promene u nivoima cisteina i taurina, krajnjih produkata metabolizma metionina nisu se mogle povezati sa uočenim promenama, što donosi novu

hipotezu, usmerenu na metioniski ciklus tj. konverzija metionina u homocistein i obratno (Koga i sar., 2021). Prilikom ovako baziranih objašnjenja odn. dizajna budućih studija neophodnim se čini uzeti u obzir i efekta koji se mogu pripisati različitim funkcionalnim nivoima kofaktora u ovom ciklusu, prvenstveno folata (Husemoen i sar., 2006). Kada se pomenuta razmatranja primene na rezultate disertacije, može se pretpostaviti da usled remisije intradermalni „utrošak“ metionina kod pasa sa atopijskim dermatitisom, a samim tim i ravnoteža metioninskog ciklusa tj. indirektno koncentracija homocisteina u serumu ne odstupaju od fizioloških granica.

Posebno interesovanje pobudio je rezultat da su u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom više vrednosti homocisteina zabeležene kod pasa brahicefaličnih nego mezocefaličnih rasa. Dodatni značaj je proizašao nakon multiple regresione analize koja je označila pripadnost nekoj od brahicefaličnih rasa kao nezavisni prediktor koncentracije homocisteina u grupi pasa sa atopijskim dermatitisom. Prema literaturni podaci navode povećanu učestanost hiperhomocisteinemije kod izvesnih rasa, poput velikog engleskog hrta (Heilmann i sar., 2017), ne nailazi se navode o povezanosti brahicefalije i povećanih koncentracija homocisteina. U prethodno pomenutoj studiji japanskih istraživača (Kakimoto i sar., 2014) psi rase Ši Cu, koje karakteriše brahicefalija, predstavljali su čak trećinu pasa u grupi sa kožnim bolestima, ali razlike u odnosu na ostale pse nisu ispitivane. Takođe, posmatrano komparativno, ovakvi rezultati bi se mogli posmatrati i kao neželjeni efekti inbreeding-a, obzirom da se kod izvesnih naslednih oboljenja ljudi, poput Daunovog sindroma (Pavarino Bertelli i sar., 2009) ili urođenih poremećaja metabolizma (Alfadhel i sar., 2015), navodi zajedničko prisustvo brahicefalije i hiperhomocisteinemije. Osim toga, nalaz većeg nivoa homocisteina daje osnova i za buduće studije o eventualnim specifičnostima homeostaze metionina kod brahicefaličnih rasa u smislu njihove podložnosti razvoju atopijskog dermatitisa. Posmatrano u kontekstu povezanosti sa brahicefaličnim sindromom, kao neupitnim uzrokom respiratornog distresa kod brahicefaličnih rasa (Dupré i Heidenreich, 2016) dalja istraživanja nivoa homocisteina bi mogla upotpuniti dosadašnje razmevanje imunometaboličkih aspekata ovog poremećaja (Gianella i sar., 2019).

6.4.2. Homocistein kod pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična sistemska inflamacija

Koncentracija homocisteina je bila niža u stanjima koje je karakterisala umerena ili jaka reakcija akutne faze (akutna babezioza i piometra) u poređenju sa zdravim odnosno psima sa infekcijama koje je karakterisala blaga, hronična reakcija akutne faze (dirofilarioza). Osim toga, posmatrano na celokupnom uzorku koncentracije homocisteina i serum amiloida A bile su u negativnoj korelaciji. Literaturni podaci upućuju na to da se stanja koja karakteriše različit stepen sistemske inflamacije mogu razlikovati na osnovu porasta serum amiloida A kao kao „glavnog“ pozitivnog reaktanta akutne faze kod pasa (Christensen i sar., 2014). Rezultati disertacije su potvrdili ovakve navode, budući da su vrednosti kod pasa i sa piometrom i dirofilarijom bile veće nego kod pasa sa dirofilarizom. Sa druge strane, diskriminatorna „moć“ homocisteina bila je slabija budući da je razlika bila prosutna samo između grupa sa dirofilariozom i piometrom. Posmatrajući ove rezultate zajedno sa prethodno objavljenim podacima o nižem nivou homocisteina kod pasa sa sindromom sistenskog inflamatornog odgovora i sepsom u odnosu na zdrave pse (Patterson i sar., 2013), relevantnim se čini posmatranje homocisteina kao negativnog reaktanta akutne faze u slučajevima kada je sistemska inflamacija uzrokovana bakterijskim ili parazitarim infekcijama.

Uzimajući u obzir podatak da je koncentracija homocisteina u krvi nakon 6 časova od obroka direktno proporcionalna sadržaju metionina u hrani (Banton i sar., 2021), smanjeno uzimanje hrane može predstavljati mogući uzrok smanjenja nivoa homocisteina kod pasa sa komplikovanim oblikom teške akutne sistemske inflamacije (Patterson i sar., 2013). Višednevna inapatenca je uobičajena kod

piometre i babezioze, a retka kod dirofilarioze (Leschnik, 2020), što bi moglo potvrditi da je izraženije smanjenje unosa metionina hranom bilo jedan od uzroka razlika u homocisteinemiji.

Skoro celokupna količina homocisteina u cirkulaciji vezana je za albumin (Hortin i sar., 2006), te bi stoga hipoalbuminemija mogla takođe predstavljati razlog sniženja koncentracije homocisteina. U grupi pasa sa babeziozom su i vrednosti albumina i homocisteina bile niže nego kod zdravih pasa, što bi govorilo u prilog ovakvoj pretpostavci. Međutim, nivo homocisteina u grupi sa piometrom je bio niži nego u grupi sa dirofilariozom premda nije bilo razlike u albiminemiji. Ovakva heterogenost rezultata naglašava potrebu daljih studija kako bi se rasvetlila multifaktorijalna priroda promena u metabolizmu homocisteina tokom infekcija kod pasa.

Pažnju privlači i činjenica da su koncentracije homocisteina i serum amiloida A bile u korelaciji sa istim parametrima (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu, broj neutrofila i glikemija), pri čemu je „smer“ korelacijabio suprotan. Prisustvo anemije kod pasa sa akutnim ili hroničnim infekcijama dolazi kao zajednički rezultat funkcionalnog nedostatka gvožđa, efekata pro-inflamatornih citokina i autoantitela (Nairz i sar., 2016). U slučajevima piometre, visoke koncentracije serum amiloida a prate izraženu leukocitozu (Jitpean i sar, 2014), dok je je istovremena pojava povećanog nivoa serum amiloida A i leukopenije česta u akutnoj babeziozi (Milanović i sar., 2017). Na ovaj način bi se mogla objasniti pozitivna korelacija broja leukocita i sa koncentracijom homocisteina i sa koncentracijom serum amiloida A. Korelacija glikemije, negativna sa koncentracijom homocisteina, odnosno pozitivna sa nivoom serum amiloida A, mogla bi odlikavati „stres“ koji se razvijao paralelno sa jačanjem sistemske inflamacije (Yuki i sar., 2019).

Istraživanje je obuhvatilo relativno mali broj pasa, tumačenje bi bilo pouzdanije da je raspodela među grupama bila ujednačenija, odnosno da su bili dostupni podaci o serumskim nivoima vitamina koji kao kofaktori učestvuju u metioninskom ciklusu. No bez obzira na navedena ograničenja rezultati nedvosmisleno govore da kod pasa sa infekcijama postoji obrnuta srazmera između nivoa homocisteina i serumskog amiloida A tj. da paralelno sa pojačavanjem sistemske inflamacije dolazi do smanjenja homocisteinemije.

6.4.3. Poređenje rezultata kod grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i grupa pasa u stanjima koje karakteriše jasna akutna ili hronična sistemska inflamacija

Korišćenje uniformne laboratorijske metodologije omogućilo je poređenje nivoa homocisteina i serum amiloida A između grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i grupa pasa sa parazitarnim i bakterijskim infekcijama. Nivoi homocisteina se nisu razlikovali između pasa sa atopijskim dermatitisom, dirofilariozom i babeziozom, ali su bili viši nego kod pasa sa piometrom. Pored razmatranja u odeljku 6.4.2. „dodatak“ grupe sa atopijskim dermatitisom u komparativnu analizu indirektno je isključio mogućnost da metabolizam parazitarog uzročnika utiče na promene u nivou homocisteina (Chillemi i sar., 2004; Gupta i Srivastava, 2005). Dodatno, psi sa piometrom, kao primerom bakterijske infekcije, imali su niže vrednosti Hcy u odnosu na pse sa atopijskim dermatitisom, te bi i to potencijalno moglo ukazivati na značaj sniženja bazalnih koncentracija homocisteina kao faktora rizika ili markera za nastanak bakterijskih komplikacija atopijskog dermatitisa. Poređenja nivoa seruma amiloida A detaljno su razmotrena u okviru odeljka 6.3.1. Međutim, uključenje grupe pasa sa atopijskim dermatitisom upotpunilo je procenu povezanosti intenziteta sistemske inflamatornog odgovora i koncentracije homocisteina. U ovako formiranom uzorku postojao je kontinuum jačine inflamacije od supkliničke hronične do jake akutne koji je bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom homocisteina. Na ovaj način povećava se relevantnost

pretpostavke o homocisteinu kao o negativnom reaktantu akutne faze kod pasa, te naglašava potreba za daljim studijama kojima bi donele odgovore da li bi takva pretpostavka imala izvestan klinički značaj ili predstavlja jedan od epifenomena u okviru omni-kompleksne inflamatorne „slagalice“.

7. ZAKLJUČCI

Poređenje hematoloških i biohemijskih parametara, zastupljenosti lipoproteinskih frakcija, pokazatelja sistemske inflamacije i koncentracije homocisteina, između grupe brahicefaličnih i mezocefaličnih pasa sa atopijskim dermatitisom u remisiji i kontrolne grupe zdravih pasa, upućuju na zaključak da psi sa atopijskim dermatitisom imaju sistemska hronična supklinička inflamacija, koja je praćena određenim stepenom akutnog stresa i dislipidemijom, a bez promene koncentracije homocisteina. Ovakav sveobuhvatni zaključak se temelji na više pojedinih zaključnih razmatranja:

1. Hematološki parametri se kod obe grupe pasa najvećim delom nalaze u referentnim intervalima. Ipak, kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolnu grupu je izmeren veći broj eozinofilnih granulocita što ukazuje na postojanje I tipa preosetljivosti. Veći broj trombocita odnosno neutrofila kod brahicefaličnih rasa unutar grupe pacijenata, najverovatnije ukazuje na izraženiju sistemska hronična supklinička inflamacija u kombinaciji sa određenim stepenom stresa, u odnosu na pse mezocefaličnih rasa.
2. Biohemijski parametri vezani za funkciju pojedinih tkiva i organa se, sa retkim izuzecima, nalaze u referentnim intervalima kod obe grupe pasa. Više koncentracije ukupnih proteina i globulina kod pasa sa atopijskim dermatitisom u odnosu na kontrolnu grupu ukazuju na sistemska hronična supklinička inflamacija, dok je povećana koncentracija glukoze ukazala na prisustvo stresne reakcije.
3. Smanjena koncentracija holesterola i potklase lipoproteina velike gustine – HDL1 (engl. *high-density lipoproteins*) je ukazivala na sistemska dislipidemiju kod pasa sa atopijskim dermatitisom.
4. Serum amiloid A kao pozitivni, i paraoksonaza 1 i apolipoprotein A1 kao negativni proteini akutne faze su bili u referentnim intervalima i nisu se razlikovali između grupe pasa sa atopijskim dermatitisom i zdravih pasa ukazujući na izuzetnu homogenost grupa vezano za akutne poremećaje zdravstvenog stanja. Tim je značajni nalaz veće koncentracije ceruloplazmina kod pasa sa atopijskim dermatitisom jer ukazuje na sistemska hronična supklinička inflamacija povezanu sa eventualnim remodelovanjem epidermisa.
5. U grupi pasa sa atopijskim dermatitisom, koncentracija homocisteina je bila viša kod brahicefaličnih u odnosu na mezocefalične rase, što daje osnovu za buduće studije o eventualnim specifičnostima homeostaze metionina/homocisteina kod brahicefaličnih rasa u smislu njihove podložnosti razvoju atopijskog dermatitisa.
6. Kod pasa koji su imali sistemska inflamacija usled infekcije nematodom *Dirofilaria immitis*, protozom *Babesia canis* i usled razvoja piometre, koncentracija homocisteina je bila obrnuto srazmerna koncentraciji serum amiloida A, odnosno, homocistein se potencijalno mogao smatrati negativnim reaktantom akutne faze. Ipak, koncentracija ove aminokiseline se nije razlikovala između pasa sa atopijskim dermatitisom, i onih koji su imali sistemska inflamacija usled infekcije *D. immitis* i *B. canis*, dok je bila značajno niža kod pasa sa piometrom. Međutim, uključivanje grupe sa atopijskim dermatitisom upotpunilo je inverznu povezanost između homocisteinemije i intenziteta sistemske inflamacije. Posmatrano kroz prizmu supkliničkih i akutnih inflamacija umerenog intenziteta, homocistein se ne može smatrati potencijalnim biomarkerom supkliničke inflamacije kod pasa.

8. LITERATURA

1. Agón-Banzo PJ, Sanmartin R, García-Malinis AJ, Hernández-Martín Á, Puzo J, Doste D, Pardos C, i Gilaberte Y, 2020. Body mass index and serum lipid profile: Association with atopic dermatitis in a paediatric population. *The Australasian journal of dermatology*, 61: e60–e64.
2. Ahn S, Bae H, Kim J, Kim S, Park J, Kim S K, Jung, DI, i Yu, D, 2021. Comparison of clinical and inflammatory parameters in dogs with pyometra before and after ovariohysterectomy. *Canadian journal of veterinary research*, 85:271–278.
3. Alfadhel M, Alrifai MT, Trujillano D, Alshaalan H, Al Othaim A, Al Rasheed S, Assiri H, Alqahtani AA, Alaamery M, Rolfs A i Eyaid W, 2015. Asparagine synthetase deficiency: new inborn errors of metabolism. *JIMD reports*, 22:11–16.
4. Almadori G, Bussu F, Galli J, Cadoni G, Zappacosta B, Persichilli S, Minucci A, i Giardina B, 2002. Serum folate and homocysteine levels in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 94:1006–1011.
5. Almela RM, Rubio CP, Cerón JJ, Ansón A, Tichy A, i Mayer U, 2018. Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 29:229-e82.
6. Ando T, Matsumoto K, Namiranian S, Yamashita H, Glatthorn H, Kimura M, Dolan BR, Lee JJ, Galli SJ, Kawakami Y, Jamora C, i Kawakami T, 2013. Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. *The journal of investigative dermatology*, 133:2695.
7. Antić M, Beletić A, Radaković M, Spariosu K, Stanković S, Trailović D, i Kovačević Filipović M, 2022. Homocysteine concentration in the serum of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. - Association with the stage of the disease, therapy, and clinical pathology data. *Acta veterinaria*, 72:309–323.
8. Arcique MA, i Bajwa J, 2020. Atopic dermatitis in humans and dogs. *The Canadian veterinary journal*, 61:82–84.
9. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EMJ, i Paus R, 2006. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *The Journal of investigative dermatology*, 126:1697–1704
10. Arda O, Göksügür N, i Tüzün Y, 2014. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32:3–13.
11. Arslan A, i Kirmizigül AH, 2020. Serum amyloid-A, haptoglobin and ceruloplasmin levels in dogs infected with *sarcoptes canis*. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15:1–6.
12. Bae Y, i Kim S-J, 2022. Serum ceruloplasmin as a potential clinical biomarker in atopic dermatitis. *Annals of dermatology*, 34:245–252.
13. Baek H, Han MY, i Choi SH, 2020. Serum lipid profiles and atopic dermatitis in children. *Journal of allergy and clinical immunology*, 145:AB96.
14. Banton S, Pezzali JG, Verbrughe A, Bakovic M, Wood KM i Shoveller AK, 2021. Addition of dietary methionine but not dietary taurine or methyl donors/receivers to a grain-

- free diet increases postprandial homocysteine concentrations in adult dogs. *Journal of animal science*, 99: skab223.
15. Barra RM, Fenjves ES, i Taichman LB, 1994. Secretion of apolipoprotein E by basal cells in cultures of epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 102:61–66.
 16. Baum D, Porte D Jr, 1980. Stress hyperglycemia and the adrenergic regulation of pancreatic hormones in hypoxia. *Metabolism*, 11:1176–85.
 17. Baumann H, i Gauldie J, 1994. The acute phase response. *Immunology today*, 15:74–80.
 18. Beletić A, 2014. Uticaj naslednih i stečenih faktora na nivo homocisteina u krvi bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća, doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
 19. Beletić A, Janjić F, Radaković M, Spariosu K, Francuski Andrić J, Chandrashekar R, Tyrrell P, Radonjić V, Balint B, Ajtić J, i Kovačević Filipović M, 2021. Systemic inflammatory response syndrome in dogs naturally infected with *Babesia canis*: Association with the parasite load and host factors. *Veterinary parasitology*, 291:109366.
 20. Beletić A, Mirković D, Antonijević N, Dordević V, Šango V, Jakovljević B, Peruničić J, Ilić M, Vasiljević Z, i Majkić-Singh N, 2009. Incidence of hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism among young patients with acute myocardial infarction. *Journal of medical biochemistry*, 28:41–45.
 21. Bergen WG, i Mersmann HJ, 2005. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *The Journal of nutrition*, 135:2499–2502
 22. Bhattacharya N, Sato WJ, Kelly A, Ganguli-Indra G, i Indra A K, 2019. Epidermal lipids: key mediators of atopic dermatitis pathogenesis. *Trends in molecular medicine*, 25:551.
 23. Biolo G, Gastaldelli A, Zhang XJ, Wolfe RR 1994. Protein synthesis and breakdown in skin and muscle: a leg model of amino acid kinetics. *The American journal of physiology*, 267: E467–E474.
 24. Blom HJ, Smulders Y, 2011. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease*, 34:75–81.
 25. Bostan Gayret O, Tekin H, Glu N, Erol M, Ahmetsener AA, 2019. Neutrophil-lymphocyte ratio and the platelet parameters as biomarkers of atopic dermatitis severity in children. *Iranian red crescent medical journal*, 21:91594.
 26. Bouwstra JA, i Ponc M, 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et biophysica acta - biomembranes*, 1758:2080–2095.
 27. Božić T, 2012. Inflamacija. In: Božić T, Patološka fiziologija domaćih životinja, Naučna KMD, Beograd, pp. 185–209.
 28. Brandt EB, i Sivaprasad U, 2011. Th2 cytokines and atopic dermatitis. *Journal of clinical i cellular immunology*, 2:110.

29. Butz LW, i du Vigneaud V, 1932. The formation of a homologue of cysteine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *Journal of biological chemistry*, 99:135–142.
30. Cabana VG, Siegel JN, i Sabesin SM, 1989. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *Journal of lipid research*, 30:39–49.
31. Carpintero R, Piñeiro M, Andrés M, Iturralde M, Alava MA, Heegaard PMH, Jobert JL, Madec F, i Lampreave F, 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs. *Infection and immunity*, 73:3184–3187.
32. Carretón E, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Tvarijonavičiute A, Caro-Vadillo A, i Montoya-Alonso JA, 2017. Acute phase proteins and markers of oxidative stress to assess the severity of the pulmonary hypertension in heartworm-infected dogs. *Parasites and vectors*, 10:165–171.
33. Cau L, Pendaries V, Lhuillier E, Thompson PR, Serre G, Takahara H, Méchin MC, i Simon M, 2017. Lowering relative humidity level increases epidermal protein deimination and drives human filaggrin breakdown. *Journal of dermatological science*, 86:106–113.
34. Çayır C, i Kozat S, 2016. Investigation of homocysteine levels in healthy dogs, iran. *Journal of veterinary science and animal husbandry*, 4:1.
35. Cerón JJ, Eckersall PD, i Martínez-Subiela S, 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary clinical pathology*, 34:85–99.
36. Chermprapai S, Broere F, Gooris G, Schlotter, YM, Rutten, VPMG, i Bouwstra, J A, 2018. Altered lipid properties of the stratum corneum in canine atopic dermatitis. *Biochimica et biophysica acta - biomembranes*, 1860:526–533.
37. Chillemi R, Zappacosta B, Simporè J, Persichilli S, Musumeci M i Musumeci S, 2004. Hyperhomocysteinemia in acute Plasmodium falciparum malaria: an effect of host–parasite interaction. *Clinica chimica acta*, 348:113–120.
38. Christensen MB, Langhorn R, Goddard A, Andreassen EB, Moldal E, Tvarijonavičiute A, Kirpensteijn J, Jakobsen S, Persson F, i Kjelgaard-Hansen M, 2014. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *The Canadian veterinary journal*, 55:161–168.
39. Chung BY, Kim HO, Park CW, Yang NG, Kim JY, Eun YS, Chung EH, Lee SY, Park YL, Lee SH, Heo NH, Shin MJ, i Kim JE, 2022. relationships of serum homocysteine, vitamin B12, and folic acid levels with papulopustular rosacea severity: a case-control study. *BioMed research international*, 2022:5479626.
40. Clayton K, Vallejo AF, Davies J, Sirvent S, i Polak M E, 2017. Langerhans cells—programmed by the epidermis. *Frontiers in immunology*, 8:1676.
41. Coderch L, López O, De La Maza A, i Parra JL, 2003. Ceramides and skin function. *American journal of clinical dermatology*, 4:107–129.
42. Combarros D, Cadiergues MC, i Simon M, 2020. Update on canine filaggrin: A review. *The Veterinary quarterly*, 40:162–168.

43. Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Wenzel J, Frank J, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B, i Baron J M, 2012. IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 129:426–433.
44. Couceiro GA, Ribeiro MM, Monteiro MM, Marcelo A, Meneses C, Karla S, Sousa SA i Coutinho LN, 2021. Prevalence of canine atopic dermatitis at the Veterinary Hospital of the “Universidade Federal Rural da Amazônia” in Belém/Pará, Brazil 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 41: e06778.
45. Crane C, Rozanski EA, Abelson AL, deLaforcade A, 2017. Severe brachycephalic obstructive airway syndrome is associated with hypercoagulability in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American association of veterinary laboratory diagnosticians, Inc*, 29:570–573.
46. Cray C, 2012. Acute phase proteins in animals. *Progress in molecular biology and translational science*, 105:113–150.
47. Cray C, Zaias J, i Altman NH, 2009. Acute Phase response in animals: A review. *Comparative medicine*, 59:517–526.
48. Daly C, Fitzgerald AP, O’callaghan P, Collins P, Cooney MT, i Graham IM, 2009. Homocysteine increases the risk associated with hyperlipidaemia. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology i Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, 16:150–155.
49. Danso M, Boiten W, van Drongelen V, Gmelig Meijling K, Gooris G, El Ghalbzouri A, Absalah S, Vreeken R, Kezic S, van Smeden J, Lavrijsen S, i Bouwstra J, 2017. Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *Journal of dermatological science*, 88:57–66.
50. Darlenski R, Kazandjieva J, Hristakieva E, i Fluhr JW, 2014. Atopic dermatitis as a systemic disease. *Clinics in dermatology*, 32:409–413.
51. Das P, Mounika P, Yellurkar ML, Prasanna VS, Sarkar S, Velayutham R, i Arumugam S, 2022. Keratinocytes: an enigmatic factor in atopic dermatitis. *Cells*, 11:1683
52. David Boothe W, Tarbox JA, i Tarbox MB, 2017. Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Advances in experimental medicine and biology*, 1027:21–37.
53. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DYM, Beck LA, 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127:773–786e7.
54. De Simoni E, Rizzetto G, Molinelli E, Lucarini G, Mattioli-Belmonte M, Capodaglio I, Ferretti G, Bacchetti T, Offidani A, i Simonetti O, 2022. Metabolic comorbidities in pediatric atopic dermatitis: A Narrative review. *Life* 2023, 13:2.
55. Debes GF, i McGettigan S E, 2019. Skin-associated B cells in health and inflammation. *Journal of immunology*, 202:1659–1666.

56. Dedac-Delkic A, Milovanovic Z, Bozovic-Ilic A, Radovanovic A, Kovacevic-Filipovic M, 2018. Effects of short-term fasting on lipid and lipoprotein concentrations in healthy lean dogs. *Veterinarski glasnik*, 72:35–43.
57. Deo PN, i Deshmukh R, 2018. Pathophysiology of keratinization. *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 22:86–91.
58. Dinarello CA, Cannon JG, Mancilla J, Bishai I, Lees J, i Coceani F, 1991. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain research*, 562:199–206.
59. Dinler Ay C, Tuna GE, Ekren Asici GS, i Ulutas B, 2022. Effects of the clinical severity of disease and concomitant pyoderma on serum acute-phase proteins concentrations in dogs with sarcoptic mange. *Veterinary dermatology*, 33:378–383.
60. Doebel T, Voisin B, i Nagao K, 2017. Langerhans cells - the macrophage in dendritic cell clothing. *Trends in immunology*, 38:817–828.
61. Dulman OM, Anton A, Solcan G, 2015. Variations in standard blood count and biochemical parameters in dogs with atopic dermatitis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine*. 72:86–89.
62. Dupré G, Heidenreich D 2016. Brachycephalic syndrome. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 46:691–707.
63. El Safoury OS, Ezzat M, Abdelhamid MF, Shoukry N, i Badawy E, 2013. The Evaluation of the impact of age, skin tags, metabolic syndrome, body mass index, and smoking on homocysteine, endothelin-1, high-sensitive C-reactive protein, and on the heart. *Indian Journal of dermatology*, 58:326.
64. Elias PM, Williams ML, Choi EH, i Feingold KR, 2014. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1841:353.
65. Emmert H, Baurecht H, Thielking F, Stölzl D, Rodriguez E, Harder I, Proksch E, i Weidinger S, 2021. Stratum corneum lipidomics analysis reveals altered ceramide profile in atopic dermatitis patients across body sites with correlated changes in skin microbiome. *Experimental dermatology*, 30:1398–1408.
66. Erjavec V, Svete AN, 2023. Thrombocytosis in brachycephalic dogs with brachycephalic obstructive airway syndrome. *Veterinarni medicina (Praha)*, 68:57–61.
67. Facin AC, Uscategui RAR, Maronezi MC, Pavan L, Menezes MP, Montanhim GL., Camacho AA, Feliciano MAR, i Moraes PC, 2020. Liver and spleen elastography of dogs affected by brachycephalic obstructive airway syndrome and its correlation with clinical biomarkers. *Scientific reports* 10:1–10.
68. Favrot C, Fischer N, Rostaher A, i Olivry T, 2021 Evaluation of plasma C-reactive protein as a biomarker in dogs with atopic dermatitis receiving allergen-specific immunotherapy: A pilot study. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 163:67–72.
69. Favrot C, Steffan J, Seewald W, i Picc F, 2010 A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary dermatology*, 21:23–31.

70. Feingold KR, 2007. Thematic review series: skin lipids The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of lipid research*, 48:2531–2546.
71. Feingold KR, 2011 Lipid metabolism in the epidermis. *Dermato-endocrinology*, 3:52.
72. Finkelstein JD, i Martin J J, 2000. Homocysteine. *The International journal of biochemistry i cell biology*, 32:385–389.
73. Fluhr JW, Kao J, Jain M, Ahn SK, Feingold KR, i Elias PM, 2001. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *The Journal of investigative dermatology*, 117:44–51.
74. Franco J, Rajwa B, Gomes P, i Hogenesch H, 2021. Local and systemic changes in lipid profile as potential biomarkers for canine atopic dermatitis. *Metabolites*, 11:670.
75. Fu L, Matsuyama I, Chiba T, Xing Y, Korenaga T, Guo Z, Fu X, Nakayama J, Mori M, i Higuchi K, 2001. Extrahepatic expression of apolipoprotein A-II in mouse tissues: possible contribution to mouse senile amyloidosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 49:739–747.
76. Fujieda Y, Manno A, Hayashi Y, Rhodes N, Guo L, Arita M, Bamba T, Fukusaki E, 2013. Inflammation and resolution are associated with upregulation of fatty acid β -oxidation in zymosan-induced peritonitis. *PLoS One*, 8:e66270.
77. Fuhrmann H, Zimmermann A, Gück T, i Oechtering G, 2006. Erythrocyte and plasma fatty acid patterns in dogs with atopic dermatitis and healthy dogs in the same household. *Canadian journal of veterinary research*, 70:191–196.
78. Ganguly P, i Alam S F, 2015. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition journal*, 14:6.
79. Gao X, Lil J, i Chen M, 2018. Effect of homocysteine on the differentiation of CD4+ T cells into Th17 cells. *Digestive diseases and sciences*, 63:3339–3347.
80. Gavish D, Oschry Y, Eisenberg S 1987. In vivo conversion of human HDL3 to HDL2 and apoE-rich HDL1 in the rat: effects of lipid transfer protein. *Journal of lipid research*, 28:257–267.
81. Gianella P, Caccamo R, Bellino C, Bottero E, Fietta F, Roncone S, Ostanello F, Pietra M i Buracco P, 2019. Evaluation of metabolic profile and C-reactive protein concentrations in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. *Journal of veterinary internal medicine*, 33:2183–2192.
82. Ginhoux F, i Jung S, 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews immunology*, 14:392–404.
83. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQF, Mitsui H, Cardinale I, De Guzman Strong C, Krueger J G, i Guttman-Yassky E, 2012. Progressive activation of Th2/Th22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 130:1344–1354.
84. Giunti M, Grossi G, Troía R, Fracassi F, i Dondi F, 2020. Evaluation of serum apolipoprotein A1 in canine sepsis. *Frontiers in veterinary science*, 7:263.

85. Głuszek J, Wierzowiecka M, Niklas K, i Niklas A, 2020. The importance of homocysteine in the development of cardiovascular complications in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatologia*, 58:282.
86. Gołyński M, Lutnicki K, Krumrych W, Szczepanik M, Gołyńska M, Wilkołek P, Adamek Sitkowski i Kurek, 2017. Relationship between total homocysteine, folic acid, and thyroid hormones in hypothyroid dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 31:1403–1405.
87. Gombart AF, Pierre A, Maggini S, 2020. A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*, 12:236.
88. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, i Koopmans SJ, 2005. Review: Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6:1045.
89. Grützner N, Heilmann RM, Stupka KC, Rangachari VR, Weber K, Holzenburg A, Suchodolski JS i Steiner JM, 2013. Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. *Veterinary journal*, 197:420–426.
90. Gupta S, i Srivastava AK, 2005. Biochemical targets in filarial worms for selective antifilarial drug design. *Acta parasitologica*, 50:1–18.
91. Gyamfi D, Awuah EO, i Owusu S, 2019. Lipid metabolism: An overview. *The Molecular nutrition of fats*, pp17–32.
92. Hagman R, 2018. Pyometra in small animals. *The veterinary clinics of North America small animal practice*, 48: 639–661.
93. Halliwell R, 2006. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 114:207–208.
94. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MAM, Kool M, Muskens F, i Lambrecht BN, 2010. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *The Journal of experimental medicine*, 207: 2097–2111.
95. Hatton C, Hay D, and Weller PF, 2020. 'Eosinophilia', in John Firth, Christopher Conlon, and Timothy Cox, *Oxford textbook of medicine*, 6 pp 5254–C22.3.8.P68.
96. Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, i Griffin C, 2015. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification *BMC. Veterinary research*, 11:1–13.
97. Heilmann RM, Grützner N, Iazbik MC, Lopes R, Bridges CS, Suchodolski JS, Couto CG, i Steiner JM, 2017. Hyperhomocysteinemia in greyhounds and its association with hypofolatemia and other clinicopathologic variables. *Journal of veterinary internal medicine*, 31:109–116.
98. Herrmann I, Einhorn L i Panakova L, 2017. Gender aspects in allergies of pets – A secondary publication and update. *World allergy organization journal*, 10:42- 10842263.
99. Hill PB, Moriello KA, DeBoer DJ, 1995. Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 44:105–113.
100. Hillier A, Griffin CE, 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81:147–151.

101. Hirakawa DA, i Baker DH, 1985. Sulfur amino acid nutrition of the growing puppy: Determination of dietary requirements for methionine and cystine. *Nutrition research*, 5:631–642.
102. Honda T, Egawa G, i Kabashima K, 2019. Antigen presentation and adaptive immune responses in skin. *International immunology*, 31:423–429.
103. Hooper JK, i Eggink LL, 2022. The discovery and function of filaggrin. *International journal of molecular sciences*, 23:1455.
104. Hortin GL, Seam N i Hoehn GT, 2006. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins. *Clinical chemistry*, 52:2258–2264.
105. Husemoen L, Toft U, Fenger M, Jørgensen T, Johansen N, Linneberg A, 2006. The association between atopy and factors influencing folate metabolism: is low folate status causally related to the development of atopy?, *International journal of epidemiology*, 35:954–961
106. Ilves L, Ottas A, Kaldvee B, Abram K, Soomets U, Zilmer M, Jaks V, i Kingo K, 2021. Metabolomic analysis of skin biopsies from patients with atopic dermatitis reveals hallmarks of inflammation, disrupted barrier function and oxidative stress. *Acta dermatovenereologica*, 101:1–8.
107. Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RAW, i Mueller RS, 2010. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology*, 21:119–123.
108. Janssens M, Van Smeden J, Gooris GS, Bras W, Portale G, Caspers PJ, Vreeken RJ, Hankemeier T, Kezic S, Wolterbeek R, Lavrijsen AP, i Bouwstra JA, 2012. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of lipid research*, 53:2755–2766.
109. Janjić F, 2021. Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima, doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
110. Janjić F, Beletić A, Radaković M, Spariosu K, Diklić M, Andrić JF, Radonjić V, Ajtić J, i Filipović MK, 2022. Seasonal differences in the intensity of acute phase response in dogs infected with *Babesia canis*. *International journal of biometeorology* 66:691–698.
111. Jitpean S, Pettersson A, Höglund OV, Holst BS, Olsson U i Hagman R, 2014. Increased concentrations of Serum amyloid A in dogs with sepsis caused by pyometra. *BMC veterinary research*, 10:273–282.
112. Jo SY, Lee CH, Jung WJ, Kim SW, Hwang YH, 2018. Common features of atopic dermatitis with hypoproteinemia. *Korean journal of pediatrics*, 61:348.
113. Kakimoto T, Iwanaga T, i Kanouchi H, 2014. Plasma homocysteine concentrations in dogs. *International journal of veterinary medicine: research i reports*, 2014:141449.
114. Kapun AP, Salobir J, Levart A, Kotnik T, i Svete AN, 2012. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Research in veterinary science*, 92:469–470.
115. Kashem SW, Haniffa M, i Kaplan DH, 2017. Antigen-presenting cells in the skin. *Annual review of immunology*, 35:469–499.

116. Kawasumi K, Kashiwado N, Okada Y, Sawamura M, Sasaki Y, Iwazaki E, Mori N, Yamamoto I, i Arai T, 2014. Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. *BMC veterinary research*, 10:57.
117. Khattab FM, i Ibraheem HA, 2022. Assessment of serum amyloid A level and the severity of atopic dermatitis. *Egyptian journal of dermatology and venerology*, 41:71–74.
118. Khnykin D, Miner JH, i Jahnsen F, 2011. Role of fatty acid transporters in epidermis: Implications for health and disease. *Dermato-endocrinology*, 3:53–61.
119. Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, i Grunfeld C, 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of lipid research*, 45:1169–1196.
120. Kim BE, Leung DYM, 2018. Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Allergy, asthma i immunology research*, 10:207–215.
121. Kim JH, Lee SW, Yon DK, Ha EK, Jee HM, Sung M, Sim HJ, Yoon JW, Choi SH, Shin YH, Seo SI, Baek H, i Han MY, 2020. Association of serum lipid parameters with the severity and onset of atopic dermatitis in children. *Authorea preprints*, 32:322–330.
122. Kisilevsky R, i Manley PN, 2012. Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the. *International society of amyloidosis*, 19:5–14.
123. Koga T, Hirayama F, Satoh T, Ishii Y, Kashige N, Hiromura M, Soeda F, i Toda A, 2021. Methionine is a key regulator in the onset of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *BPB reports*, 4:47–54.
124. Koj A, 1996. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et biophysica acta*, 1317:84–94.
125. Korniluk A, Koper-Lenkiewicz OM, Kamińska J, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V, 2019. Mean platelet volume (MPV): New perspectives for an old marker in the course and prognosis of inflammatory conditions. *Mediators of inflammation*, 2019:9213074.
126. Kosić LS, i Lalošević V!!!!!!!, 2020. Dog heartworm disease is here to stay: the most important aspects of clinical relevance. *Veterinarski glasnik*, 74:125–143.
127. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, i Wood JG, 2016. Mast cell: A multi-functional master cell. *Frontiers in immunology*, 6:620.
128. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, i Amagai M, 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *The Journal of experimental medicine*, 206:2937–2946.
129. Kulka M, 2016. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. *Polish journal of veterinary sciences*, 19:225–232.
130. Kusunoki T, Mukaida K, Morimoto T, Yasumi T, Nishikomori R, Heike T, Fujii T, i Nakahata T, 2010. Total and LDL cholesterol are associated with atopic status in schoolchildren. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125:AB190.

131. Lauber B, Molitor V, Meury S, Doherr MG, Favrot C, Tengvall K, Bergvall K, Leeb T, Roosje P, Marti E, 2012. Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. *Veterinary immunology and immunopathology*, 149:112–118.
132. Lee S-G i Hyun C, 2012. Evaluation of homocysteine levels in dogs with chronic mitral valve insufficiency. *The Veterinary record*, 171:220–221.
133. Leiferman KM, i Peters MS, 2018. Eosinophil-related disease and the skin. *The Journal of allergy and clinical immunology: in practice*, 6:1462-1482e6.
134. Leigh JH, Park HJ, Chun SM, Min YS, i Choi M, 2021. Association of atopic dermatitis with dyslipidemia in adolescents: A cross-sectional study. *Annals of dermatology*, 33:483–485.
135. Leschnik M, 2020. Focus on common small animal vector-borne diseases in central and southeastern europe. *Acta veterinaria*, 70:147–169.
136. Leveque N, Robin S, Muret P, Mac-Mary S, Makki S, i Humbert P, 2003. High iron and low ascorbic acid concentrations in the dermis of atopic dermatitis patients. *Dermatology*, 207:261–264.
137. Lilliehöök I, Gunnarsson L, Zakrisson G, Tvedten H, 2000. Diseases associated with pronounced eosinophilia: a study of 105 dogs in Sweden. *Journal of small animal practice*, 41:248–253.
138. Lim HK, Rahim AB, Leo VI, Das S, Lim TC, Uemura T, Igarashi K, Common J i Vardy LA, 2018. Polyamine regulator AMD1 promotes cell migration in epidermal wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 138:2653–2665.
139. Lin X, Meng X, i Song Z, 2019. Homocysteine and psoriasis. *Bioscience reports*, 39: BSR20190867.
140. Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M, 2012. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *North American journal of medical sciences*, 4:523–532.
141. Liu CC, i Ahearn JM, 2005. Chapter 10 – Acute-Phase proteins and inflammation: immunological and clinical implications. *Measuring Immunity: basic science and clinical practice*.
142. Liu HH, Shih TS, Huang HR, Huang SC, Lee LH, i Huang YC, 2013. Plasma homocysteine is associated with increased oxidative stress and antioxidant enzyme activity in welders. *The Scientific world journal*, 2013:370487.
143. Long Y, i Nie J, 2016. Homocysteine in renal injury. *Kidney diseases*, 2:80–87
144. Lorincz AL, i Stoughton RB, 1958. Specific metabolic processes of skin. *Physiological reviews*, 38:481–502.
145. Mackness B, Durrington PN, i Mackness MI, 1998. Human serum paraoxonase. *General pharmacology*, 31:329–336.

146. Majewska A, Gajewska M, Dembele K, Maciejewski H, Prostek A, Jank M, 2016. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary research*, 12:174.
147. Malin K, i Witkowska-Piłaszewicz O, 2022. C-reactive protein as a diagnostic marker in dogs: A review. *Animals: An open access journal from MDPI*, 12(20).
148. Mao-Qiang M, Elias PM, i Feingold KR, 1993. Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. *The Journal of clinical investigation*, 92:791–798.
149. Marković D, Radovanović A, Milošević I, Lužajić Božinovski T, i Milošević S, 2016. Histologija sa embriologijom 2 Praktikum KMD Naučna.
150. Marsella R, 2021. Atopic dermatitis in domestic animals: what our current understanding is and how this applies to clinical practice. *Veterinary sciences*, 8:124.
151. Marsella R, i De Benedetto A, 2017. Atopic dermatitis in animals and people: an update and comparative review. *Veterinary sciences*, 4:37.
152. Marzouk H, Mostafa N, Khalifa I, Badawi N, Mohamed Fathy Sabry NI, 2020. red cell distribution width (RDW) as a marker of subclinical inflammation in children with familial mediterranean fever. *Curren rheumatology reviews*, 16:298–303.
153. Matijatko V, Mrljak V, Kiš I, Kučer N, Foršek J, Živičnjak T, Romić Ž, Šimec Z, i Ceron JJ, 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, 144:242–250.
154. Mazrier H, Vogelnest LJ, Thomson PC, Taylor RM i Williamson P, 2016. Canine atopic dermatitis: breed risk in Australia and evidence for a susceptible clade. *Veterinary dermatology*, 27:167-e42.
155. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, i Venco L, 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in parasitology*, 66:193–285.
156. Méndez JC, Carretón E, Martínez S, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, i Montoya-Alonso JA 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*, 204:420–425.
157. Micháľová A, Takáčová M, Karasová M, Kunay L, Grelová S, Fialkovičová M, 2022. Comparative study of classical and alternative therapy in dogs with allergies. *Animals (Basel)*. 12:1834.
158. Miglio A, Valente C, Guglielmini C, 2023. Red blood cell distribution width as a novel parameter in canine disorders: literature review and future prospective. *Animals (Basel)*. 13:985.
159. Mikael LG, Genest J, i Rozen R, 2006. Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. *Circulation research*, 98:564–571.
160. Milanović Z, 2018. Disproteinemija i dislipoproteinemija tokom odgovora akutne faze kod pasa prirodno inficiranih sa *Babesia canis*, doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

161. Milanović Z, Beletić A, Vekić J, Zeljković A, Andrić N, Božović AI, Spariosu K, Radaković, M, Ajtić J, i Filipović MK, 2020. Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, 282:109140.
162. Milanović Z, Ilić A, Andrić JF, Radonjić V, Beletić A, i Filipović MK, 2017. Acute-phase response in *Babesia canis* and *Dirofilaria immitis* co-infections in dogs. *Ticks and tick-borne diseases*, 8:907–914.
163. Milanović Z, Vekić J, Radonjić V, Ilić Božović A, Zeljković A, Janac J, Spasojević-Kalimanovska V, Buch J, Chandrashekar R, Bojić-Trbojević Ž, Hajduković L, Christopher MM, i Kovačević Filipović M, 2019. Association of acute *Babesia canis* infection and serum lipid, lipoprotein, and apoprotein concentrations in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 33:1686–1694.
164. Mohamed AA, Salah M, Bedair NI, Bassiouny DM, Daifalla AEM, Behairy OG, Fawazy N, Al Soda MF, i Farag YMK, 2021. Metabolic and inflammatory biomarkers in children with atopic dermatitis (AD): a case-control study. *Egyptian pediatric association gazette*, 69:1–5.
165. Mohamed OSD, Azmy GJ, Elfadl EMA, 2020. Clinical significance of red blood cell distribution width in systemic lupus erythematosus patients. *Egyptian rheumatology and rehabilitation* 47:1–8.
166. Mommaas-Kienhuis AM, Grayson S, Wijsman MC, Vermeer BJ, i Elias PM, 1987. Low density lipoprotein receptor expression on keratinocytes in normal and psoriatic epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 89:513–517.
167. Moon TC, Dean Befus A, i Kulka M, 2014. Mast cell mediators: Their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in immunology*, 5:569.
168. Motegi SI, Toki S, Yamada K, Uchiyama A, i Ishikawa O, 2014. Elevated plasma homocysteine level is possibly associated with skin sclerosis in a series of Japanese patients with systemic sclerosis. *The Journal of dermatology*, 41:986–991.
169. Murata T, Honda T, Mostafa A, Kabashima K, 2022. Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes. *Trends in molecular medicine*, 28:350-359.
170. Nairz M, Theurl I, Wolf D i Weiss G, 2016. Iron deficiency or anemia of inflammation? *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 166:411–423.
171. Namazi MR, i Feily A, 2011. Homocysteine may accelerate skin aging: A new chapter in the biology of skin senescence? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64:1175–1178.
172. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, i Nickoloff BJ, 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews immunology*, 9:679–691.
173. Nguyen AV, i Soulika AM, 2019. The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of molecular sciences*, 20:1811.
174. Nikkari T, Schreiberman PH, i Ahrens EH 1975. Isotope kinetics of human skin cholesterol secretion. *The Journal of experimental medicine*, 141:620–634.

175. Nomura I, Katsunuma T, Tomikawa M, Shibata A, Kawahara H, Ohya Y, Abe J, Saito H, i Akasawa A, 2002. Hypoproteinemia in severe childhood atopic dermatitis: A serious complication. *Pediatric allergy and immunology*, 13:287–294.
176. Novak N, 2012. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 129:879–886.
177. Nunn JF, 1987. Clinical aspects of the interaction between nitrous oxide and vitamin B12. *British journal of anaesthesia*, 59:3–13.
178. Oliveira C, i Torres T, 2019. More than skin deep: the systemic nature of atopic dermatitis. *European journal of dermatology*, 29:250–258.
179. Olivera A, Beaven MA, i Metcalfe DD, 2018. Mast cells signal their importance in health and disease. *Journal of allergy and clinical immunology*, 142:381–393.
180. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, i Prélaud P, 2010. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary dermatology*, 21:233–248.
181. Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, i Hill PB, 2014. Validation of the canine atopic dermatitis extent and severity index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary dermatology*, 25:77-e25.
182. On HR, Lee SE, Kim SE, Hong WJ, Kim HJ, Nomura T, Suzuki S, Shimizu H, i Kim SC, 2017. Filaggrin mutation in korean patients with atopic dermatitis. *Yonsei medical journal*, 58:395–400.
183. Ong PY, i Leung DYM, 2006. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports*, 6:384–389.
184. Otsuka M, Egawa G, i Kabashima K, 2018. Uncovering the mysteries of langerhans cells, inflammatory dendritic epidermal cells, and monocyte-derived langerhans cell-like cells in the epidermis. *Frontiers in immunology*, 9:1768.
185. Patterson BE, Barr JW, Fosgate GT, Berghoff N, Steiner JM, Suchodolski JS, i Black DM, 2013. Homocysteine in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of small animal practice*, 54:620–624.
186. Pavarino Bertelli EC, Biselli JM, Bonfim D, Goloni-Bertollo EM, 1992. Clinical profile of children with Down syndrome treated in a genetics outpatient service in the southeast of Brazil. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, 55:547–552.
187. Perła-Kaján J, i Jakubowski H, 2012. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino acids*, 43:1405–1417.
188. Petje LM, Jensen SA, Szikora S, Sulzbacher M, Bartosik T, Pjevac P, Hausmann B, Hufnagl K, Untersmayr E, Fischer L, Vyskocil E, Eckl-Dorna J, Jensen-Jarolim E, Hofstetter G, Afify SM, Krenn CG, Roth GA, Rivelles E, Hann S, i Roth-Walter F, 2021. Functional iron-deficiency in women with allergic rhinitis is associated with symptoms after nasal provocation and lack of iron-sequestering microbes. *Allergy*, 76:2882–2886.

189. Plevnik Kapun A, Salobir J, Levart A, Tavčar Kalcher G, Nemec Svete A, i Kotnik T, 2013. Plasma and skin vitamin E concentrations in canine atopic dermatitis. *The veterinary quarterly*, 33:2–6.
190. Ploder M, Kurz K, Spittler A, Neurauter G, Roth E, i Fuchs D, 2010. Early increase of plasma homocysteine in sepsis patients with poor outcome. *Molecular medicine*, 16:498–504.
191. Polcari I, Becker L, Stein SL, Smith MS, i Paller AS, 2014. Filaggrin gene mutations in African Americans with both ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *Pediatric dermatology*, 31:489–492.
192. Ponc M, te Pas,MFW, Havekes L, Boonstra J, Mommaas AM, i Vermeer BJ 1992. LDL receptors in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 98:50S–56S.
193. Popa I, Remoue N, Osta B, Pin D, Gatto H, Haftek M, i Portoukalian J, 2012. The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. *Clinical and experimental dermatology*, 37: 665–671.
194. Prélaud P, Guaguère É, Alhaidari Z, Faivre N, Héripret D, i Gayerie A, 1998. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Revue De Medecine Veterinaire* 149:1057–1064.
195. Presland RB, i Dale BA, 2000. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 11:383–408.
196. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MN, Santoro D, Nuttall T, Marsella R, 2015. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26:115–e30.
197. Quaresma JAS, 2019. Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 32:e00034–18.
198. Radovanović N, Antonijević N, Beletić A, Peruničić J, Kočica M, Mirković D, Lacković V, i Lačković M, 2010. Hyperhomocysteinemia in patients with pulmonary embolism. *Archives of biological sciences*, 62:907–914.
199. Ramon A, i Anson A “Acute phase proteins profile in atopic dogs” 16th Annual Meeting og German Society For Veterinary Dermatology, 14–16 June 2015, Mannheim, Germany
200. Rizzo G, i Laganà AS, 2020. The link between homocysteine and omega-3 polyunsaturated fatty acid: critical appraisal and future Directions. *Biomolecules*, 10:219.
201. Robert K, Maurin N, Ledru A, Delabar J, i Janel N, 2004. Hyperkeratosis in cystathionine beta synthase-deficient mice: An animal model of hyperhomocysteinemia. *The Anatomical record part a: discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 280:1072–1076.
202. Romagnani S, 1999. Th1/Th2 cells. *Inflammatory bowel diseases*, 5:285–294.
203. Romagnuolo J, Fedorak RN, Dias VC, Bamforth F, i Teltscher M, 2001. Hyperhomocysteinemia and inflammatory bowel disease: prevalence and predictors in a cross-sectional study. *The American journal of gastroenterology*, 96:2143–2149.

204. Rossi S, Rossi G, Giordano A, i Paltrinieri S, 2008. Homocysteine measurement by an enzymatic method and potential role of homocysteine as a biomarker in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 20:644–649.
205. Sævik BK, Thoresen SI, i Taugbøl O, 2002. Fatty acid composition of serum lipids in atopic and healthy dogs. *Research in veterinary science*, 73:153–158.
206. Saleem MD, Oussedik E, D’Amber V, i Feldman SR, 2017. Interleukin-31 pathway and its role in atopic dermatitis: a systematic review. *The Journal of dermatological treatment*, 28:591–599.
207. Salmon JK, Armstrong CA, i Ansel JC, 1994. The skin as an immune organ. *Western journal of medicine*, 160:146.
208. Satoh T, 2011. Basophils in skin inflammation. *Nihon Rinsho Men’eki Gakkai kaishi = Japanese journal of clinical immunology*, 34:63–69.
209. Satyanarayana G, Keisham N, Batra HS, V, SM, Khan M, Gupta S, i Mahindra V, 2021. Evaluation of serum ceruloplasmin levels as a biomarker for oxidative stress in patients with diabetic retinopathy. *Cureus*, 13:e13070.
210. Schafer L, i Kragballe K, 1991. Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 96:10–15.
211. Schlitzer A, Sivakamasundari V, Chen J, Sumatoh HR Bin, Schreuder J, Lum J, Malleret B, Zhang S, Larbi A, Zolezzi F, Renia L, Poidinger M, Naik S, Newell EW, Robson P, i Ginhoux F, 2015. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nature immunology*, 16:718–728.
212. Scott D, 2001. Structure and function of the skin. *Muller i Kirk’s Small Animal Dermatology*, 6:1–70.
213. Scott IR, i Harding CR, 1986. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Developmental biology*, 115:84–92.
214. Seino S, Tanaka Y, Honma T, Yanaka M, Sato K, Shinohara N, Ito J, Tsuduki T, Nakagawa K, Miyazawa T, Ikeda I, 2012. Atopic dermatitis causes lipid accumulation in the liver of NC/Nga mouse. *Journal of clinical biochemistry nutrition*, 50:152–157.
215. Selhub J, 1999. Homocysteine metabolism. *Annual review of nutrition*, 19:217–246.
216. Shaikh Mohiuddin S, i Manjrekar P, 2018. Role of ceruloplasmin as a low grade chronic inflammatory marker and activated innate immune system in pathogenesis of diabetes mellitus. *Journal of diabetes, metabolic disorders i control*, 5:148–153.
217. Simon D, Braathen LR, Simon HU, 2004. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy: European journal of allergy and clinical immunology*, 59:561–570.
218. Smith KM, Lawn RM, Wilcox JN, 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin-cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *Journal of lipid research*, 31:995–1004.

219. Sparber F, 2014. Langerhans cells: an update. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12:1107–1111.
220. Spariosu K, 2022. Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *Babesia canis*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
221. Spariosu K, Janjić F, Andrić JF, Radaković M, Beletić A, Filipović MK, i Milanović S, 2021. Relationship between changes in hematological parameters, levels of acute phase proteins and redox homeostasis during acute *Babesia canis* infection in dogs. *Acta veterinaria*, 71:158–169.
222. Sterlien J, 1978. Lymphocyte traffic, T-cell malignancies and the skin. *Journal of investigative dermatology*, 71:167–171.
223. Suzuki H, Sugaya M, Nakajima R, Oka T, Takahashi N, Nakao M, Miyagaki T, Asano Y, i Sato S, 2018. Serum amyloid A levels in the blood of patients with atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma. *The Journal of dermatology*, 45:1440–1443.
224. Taneja K, Taneja J, Kaur C, Patel S, i Haldar D, 2020. Lipid risk factors in vitiligo: Homocysteine the connecting link? *Clinical laboratory*, 66:1987–1991.
225. Tang, TS, Bieber T i Williams HC, 2014. Are the concepts of induction of remission and treatment of subclinical inflammation in atopic dermatitis clinically useful? *Journal of allergy and clinical immunology*, 133:1615–1625.e1.
226. Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, i Weninger W, 2013. The skin-resident immune network. *Current dermatology reports* 3:13–22.
227. Terada Y, Nagata M, Murayama N, Nanko H, i Furue M, 2011. Clinical comparison of human and canine atopic dermatitis using human diagnostic criteria (Japanese Dermatological Association, 2009): Proposal of provisional diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *The Journal of dermatology*, 38:784–790.
228. Thomsen SF, 2014. atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy*, 2014:1–7.
229. Thomsett LR, 1986. Structure of canine skin. *British veterinary journal*, 142:116–123.
230. Tokura Y, Phadungsaksawasdi P, Kurihara K, Fujiyama T, i Honda T, 2021. Pathophysiology of skin resident memory T cells. *Frontiers in immunology*, 11:3789.
231. Torun E, Gedik AH, Cakir E, Umutoglu T, Gok O, i Kilic U, 2014. Serum paraoxonase 1 activity and oxidative stress in pediatric patients with pulmonary tuberculosis. *Medical principles and practice*, 23:426.
232. Toyran M, Kaymak M, Vezir E, Harmanci K, Kaya A, Giniş T, Köse G, i Kocabaş CN, 2012. Trace element levels in children with atopic dermatitis. *Journal of investigational allergology i clinical immunology*, 22:341–344.
233. Trieb M, Wolf P, Knuplez E, Weger W, Schuster C, Peinhaupt M, Holzer M, Trakaki A, Eichmann T, Lass A, Wadsack C, Schuligoi R, Heinemann A, i Marsche, G, 2019. Abnormal composition and function of high-density lipoproteins in atopic dermatitis patients. *Allergy*, 74:398.

234. Troen A, Rosenberg I, 2005. Homocysteine and cognitive function. *Seminars in vascular medicine*, 5:209–214.
235. Ueland PM, McCann A, Midttun Ø, Ulvik A, 2016. Inflammation, vitamin B6 and related pathways. *Molecular aspects of medicine*, 53:10–27.
236. Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, i Karagenc T, 2005. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Veterinary clinical pathology*, 34:144–147.
237. Ulutaş PA, Ulutaş B, Sarierler M, i Bayramli G, 2007. Araştırma Makalesi Serum haptoglobin and ceruloplasmin concentrations in dogs with various diseases. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ*, 33:35–42.
238. Urban K, Chu S, Giesey RL, Mehrmal S, Uppal P, Nedley N, i Delost GR, 2021. The global, regional, and national burden of atopic dermatitis in 195 countries and territories: An ecological study from the Global Burden of Disease Study 2017. *JAAD International*, 2:12–18.
239. Urieli-Shoval S, Cohen P, Eisenberg S, i Matzner Y, 1998. Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues Predominant localization to the epithelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 46:1377–1384.
240. Van Der Valk RJP, Kiefte-De Jong JC, Sonnenschein-Van Der Voort AMM, Duijts, L, Hafkamp-De Groen E, Moll HA, Tiemeier H, Steegers EAP, Hofman A, Jaddoe VWV, i De Jongste JC, 2013. Neonatal folate, homocysteine, vitamin B12 levels and methylenetetrahydrofolate reductase variants in childhood asthma and eczema. *Allergy*, 68:788–795.
241. Van Wyngene L, Vandewalle J, Libert C, 2018. Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO molecular medicine*, 10:e8712.
242. Vanderjagt DJ, Patel RJ, El-Nafaty AU, Melah GS, Crossey MJ, i Glew RH, 2004. High-density lipoprotein and homocysteine levels correlate inversely in preeclamptic women in northern Nigeria. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 83:536–542.
243. Vekaria AS, Brunner PM, Aleisa AI, Bonomo L, Lebwohl MG, Israel A, Guttman-Yassky E, Navarini AA, Su JC, i Menter A, 2017. Atopic dermatitis patients show increases in serum C-reactive protein levels, correlating with skin disease activity. *F1000Research* 6:1712.
244. Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, i French LE, 2007. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *Journal of investigative dermatology*, 127:1956–1963.
245. Wertz PW, Cho ES, i Downing DT, 1983. Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 753:350–355.
246. Wilgus TA, Roy S, i McDaniel JC, 2013. Neutrophils and wound repair: Positive actions and negative reactions. *Advances in wound care*, 2:379.

247. Willemse T, 1988. Atopic dermatitis in dogs: Current diagnostic criteria. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 113:74–79.
248. Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, i Carter SD, 2009. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of dermatological science*, 55:27–33.
249. Wu JT, 2007. Circulating homocysteine is an inflammation marker and a risk factor of life-threatening inflammatory diseases. *Journal of biomedical and laboratory science*, 19:107–111.
250. Xenoulis PG, i Steiner JM. 2010. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Veterinary journal*, 183:12–21.
251. Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, i Colegio OR, 2017. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 469:455–463.
252. Yilmaz N, 2012. Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Archives of medical science* 8:138–153.
253. Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, i Amagai M, 2014. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 134:856–864.
254. Yuki M, Aoyama R, Hirano T, Tawada R, Ogawa M, Naitoh E, Kainuma D, i Nagata N, 2019. Investigation of serum cortisol concentration as a potential prognostic marker in hospitalized dogs: a prospective observational study in a primary care animal hospital. *BMC veterinary research* 15:1–9.
255. Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Giardina B, i De Sole P, 2000. Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, 15:257–260.
256. Zhang C, Merana GR, Harris-Tryon T, i Scharschmidt TC, 2022. Skin immunity: dissecting the complex biology of our body's outer barrier. *Mucosal immunology*, 15:551–561.
257. Zhang JM, i An J, 2007. Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45:27–37.
258. Zhang XJ, Chinkes DL, i Wolfe RR, 2003. Measurement of protein metabolism in epidermis and dermis. *American journal of physiology - endocrinology and metabolism*, 284:1191–1201.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Anja Ilić Božović

broj upisa:

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Pokazatelji sistemske inflamacije i nivo homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.4.2023.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Anja Ilić Božović

Broj upisa 2014/5009

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: **Pokazatelji sistemske inflamacije i nivo homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom**

Mentor 1: Prof. dr Milica Kovačević Filipović, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Mentor 2: Dr Anđelo Beletić, Univerzitetski klinički centar Srbije, Centar za medicinsku biohemiju

Potpisana: Anja Ilić Božović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.4.2023.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Pokazatelji sistemske inflamacije i nivo homocisteina kod pasa sa atopijskim dermatitisom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

Biografija autora:

Anja Ilić Božović je rođena 26.5.1987. u Beogradu, završila je Zemunsku gimnaziju a potom i diplomirala na FVM UB 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,96 i stekla zvanje doktora veterinarske medicine. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je 2014. godine. Od 2015. godine angažovana je kao istraživač pripravnik na projektu „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja” (OI 175061), kojim rukovodi prof. dr Milica Kovačević Filipović. Tokom rada na projektu savladala je osnovne tehnike rada u laboratoriji, praktičnu primenu elektroforetskih tehnika, te rad na biohemijskim i hematološkim analizatorima. Od 2016. godine radi kao asistent na Katedri za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači na FVM UB. Pored praktične nastave, učestvuje i u stručnom radu Nastavne bolnice za male životinje, te rukovodi centralnim magazinom za klinike FVM UB. Rezultati istraživanja u kojima je kandidatkinja učestvovala objavljeni su u formi sedam članka u inostranim i nacionalnim časopisima.