

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Interferometrie, Meibometrie und biochemische Analyse der Lipidschicht des Tränenfilms beim Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anna Maria Ewert geb. Borowiak
Tierärztin aus Sieraków

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3533

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunberg

Erster Gutachter: Frau Prof. Dr. med. vet. J. C. Eule

Zweiter Gutachter: Herr PD Dr. rer. nat. C. Gabler

Dritter Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Zentek

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dog diseases, eye diseases, tears, lacrimal apparatus, lipids, diagnostic techniques,
interferometry

Tag der Promotion: 05.06.2012

Meinen Eltern

Alicja & Grzegorz Borowiak

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Anatomie des äußeren Auges.....	2
2.2 Anatomie und Physiologie der Augenlider und des Tränenapparats.....	4
2.2.1 Augenlider.....	4
2.2.2 Konjunktiva.....	6
2.3 Sekretorische Anteile des Tränenapparats.....	6
2.3.1 Tränendrüse (<i>Gl. lacrimalis</i>).....	7
2.3.2 Nickhautdrüse (<i>Gl. membranae nictans</i>).....	7
2.3.3 Meibom Drüse (<i>Gl. tarsalis</i>).....	7
2.3.4 Akzessorische Tränendrüsen (<i>Gll. lacrimalis accessoria</i>).....	11
2.4 Morphologie und Physiologie des Tränenfilms.....	11
2.4.1 Muzinschicht.....	12
2.4.2 Wässrige Phase.....	13
2.4.3 Lipidschicht.....	14
2.4.3.1 Endokrine Steuerung der Lipidproduktion.....	15
2.4.3.2 Nervale Steuerung der Lipidproduktion.....	16
2.4.3.3 Alters- und geschlechtsbedingte Beeinflussung der Lipidproduktion.....	16

2.5	Tränenfilm betreffende Erkrankungen des Hundeauges	17
2.5.1	Hyperevaporatives „trockenes Auge“	18
2.5.2	Meibomitis/Blepharitis.....	18
2.5.3	Meibom Drüsen Dysfunktion.....	19
2.6	Diagnostika zur Untersuchung des Tränenfilms	20
2.6.1	Spaltlampenbiomikroskopie.....	21
2.6.2	Schirmer Tränen Test.....	21
2.6.3	Tränenfilmaufrisszeit	22
2.6.4	Interferometrie.....	23
2.6.5	Meibometrie	25
2.7	Lipide und aktueller Wissenstand zur Lipidschicht des Tränenfilms	25
2.7.1	Lipidgruppen	25
2.7.2	Fettsäuren	26
2.7.3	Wachse	27
2.7.4	Phospho-, Sphingolipide, Cerebroside.....	27
2.7.5	Cholesterol	28
2.7.6	Glycerole, Hydrocarbone	28
2.7.7	Biochemische Verfahren zur Analyse von Lipiden	28
2.7.8	Biochemie der Lipide.....	29
2.7.9	Wissensstand zur Biochemie der Lipidschicht des Tränenfilms	29
3	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	35
4	Material und Methoden.....	36
4.1	Material	36
4.1.1	Pilotprojekt zur Reproduzierbarkeit.....	36
4.1.2	Hauptprojekt zur Anwendbarkeit der Interferometrie und Meibometrie	36

4.1.3	Untersuchung der Blutfettwerte und des Schilddrüsenhormons T4	37
4.1.4	Biochemische Analyse des caninen Meibom Sekrets	37
4.1.5	Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren – eine Fütterungsstudie	38
4.2	Methodik	38
4.2.1	Voruntersuchungen	39
4.2.2	Augenuntersuchung	39
4.2.3	Schirmer Tränen Test I.....	40
4.2.4	Interferometrie.....	40
4.2.5	Meibometrie	41
4.2.6	Probengewinnung.....	43
4.2.7	Probenaufarbeitung	44
4.3	Biochemische Analyse	45
4.4	Statistische Auswertung	45
5	Ergebnisse	47
5.1	Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit	47
5.1.1	Einzelergebnisse des Schirmer Tränen Tests I	47
5.1.2	Einzelergebnisse der Interferometrie	51
5.1.3	Einzelergebnisse der Meibometrie.....	53
5.1.4	STT I und Interferometrie	56
5.2	Ergebnisse des Hauptprojekts	57
5.2.1	Einzelergebnisse.....	59
5.2.1.1	Schirmer Tränen Test I.....	59
5.2.1.2	Interferometrie.....	59
5.2.1.3	Meibometrie	62

5.2.1.4	Betrachtung der Interferenzmuster und des STT I.....	63
5.2.1.5	Betrachtung Interferenzen und Meibometrie	65
5.2.1.6	Betrachtung der Interferenzmuster und der Altersverteilung der Probanden.....	68
5.2.1.7	Betrachtung der Interferenzmuster und der Geschlechtsverteilung der Probanden	69
5.2.1.8	Betrachtung der Interferenzmuster und der Blutfettwerte	70
5.2.1.9	Betrachtung der Interferenzmuster und des Schilddrüsenwertes T4	71
5.2.1.10	Betrachtung STT I und Meibometrie	74
5.3	Ergebnisse der biochemischen Lipidanalyse.....	75
5.4	Ergebnisse der Supplementierung mit essenziellen Fettsäuren.....	76
6	Diskussion.....	80
7	Zusammenfassung.....	91
8	Summary	93
9	Literaturverzeichnis	95
10	Anhang: Tabellen und Grafiken.....	104
11	Publikationsverzeichnis	116
12	Danksagungen.....	117
13	Selbstständigkeitserklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
Abk.	= Abkürzung
APCI MS	= chemische Ionisation bei Atmosphärendruck mit Massenspektrometrie (engl. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>)
API MS	= Atmosphärendruck Ionisation mit Massenspektrometrie (engl. <i>Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry</i>)
C	= Kohlenstoff
DAG	= Diacylglycerin
d.h.	= das heißt
dl	= Deziliter
EDE	= Evaporative dry eye
engl.	= englisch, aus dem Englischen
ESI MS	= Elektrospray Ionisation mit Massenspektrometrie
ER	= endoplasmatisches Reticulum
et al.	= et alii
FS	= Fettsäuren
GC	= Gaschromatographie
Gl.	= Glandula
Gll.	= Glandulae
HPLC	= Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Ig	= Immunoglobuline
KCS	= Keratokonjunktivitis sicca
Kg	= Kilogramm
KGW	= Körpergewicht
l	= Liter
LS	= Lipidschicht
M.	= Musculus
MAG	= Monoacylglycerin

MD	= Meibom Drüsen
MGD	= Meibomian Gland Dysfunction
mg	= Milligramm
Min	= Minute
Mm.	= Musculi
mm	= Millimeter
µm	= Mikrometer
MS	= Meibom Sekret
MU	= Meibom Units
n	= Anzahl der untersuchten Probanden
OD	= Oculus dexter
OS	= Oculus sinister
p	= statistische Signifikanz
PL	= Phospholipide
s	= Sekunden
s.	= siehe
SD	= Standardabweichung
s.o.	= siehe oben
STT	= Schirmer Tränen Test
syn.	= Synonym
Tab.	= Tabelle
TAG	= Triacylglycerin
TF	= Tränenfilm
TFBUT	= Tränenfilmaufrisszeit (engl. <i>Tear Film Breakup Time</i>)
TLC	= Dünnschichtchromatographie (engl. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
versch.	= verschiedene

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der anatomischen Gegebenheiten des Hundeauges (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule).....	4
Abb. 2: schematische Darstellung der sekretorischen Anteile am Hundeauge (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule)	7
Abb. 3: Schematischer Querschnitt durch das obere Lid des Hundes (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule)	9
Abb. 4: Dreischichtiger Aufbau des präkornealen Tränenfilms	12
Abb. 5: Übersichtstafel zur Beurteilung der Lipidschichtdicke am menschlichen Auge (Quelle Fa. Keeler)	24
Abb. 6: Tearscope-plus® (links) und im Gebrauch am Hund mit Vergrößerungslinse (10 Dioptrien).....	41
Abb. 7: Entnahme des Meibom Sekrets am evertierten Unterlid mittels saugfähiger Plastikschlaufe	42
Abb. 8 Einsetzen des Messstreifens in die Messeinheit des Meibometers (linkes Bild) und das gleichmäßige Bewegen des Messstreifens in der photometrischen Einheit (rechtes Bild)	42
Abb. 9: Messergebnisse der Meibometrie- Messung, wie sie mittels EDV dargestellt werden	42
Abb. 10: Nach sanften Druck (soft squeeze) sammelt sich klares Meibom Sekret im Bereich der Drüsenausführungsgänge am Unterlid (s. Pfeil).....	44
Abb. 11: Evaporation des Lösungsmittels mit reinem Stickstoff unter einem Laminarflow... 44	
Abb. 12: Graphische Darstellung der STT I Werte (in mm/Min) von 3 Tagen zur gleichen Uhrzeit am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) der Probanden (X-Achse)	50
Abb. 13: Graphische Darstellung der STT I Werte (in mm/Min) aus drei Messungen an einem Tag (Tag 3) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) der Probanden (X-Achse). 50	
Abb. 14: Graphische Darstellung der Meibometriemessungen (angegeben in Meibom Units, MU) von 3 Tagen zur gleichen Uhrzeit gemessen (15:00 Uhr) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) von acht untersuchten Probanden (X-Achse).....	55

Abb. 15: Graphische Darstellung der gemittelten Meibometrie Messwerte (in Meibom Units, MU) aus drei Messungen an einem Tag (Tag 3) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) ein jeden der acht Probanden (X-Achse)	55
Abb. 16: Graphische Darstellung der beobachteten Interferenzmuster und der dazugehörigen STT I Werte (n=80, 10 Messungen je Tier) während der Wiederholbarkeitsstudie.....	56
Abb. 17: Alters- und Geschlechtsverteilung aller untersuchten Hunde (n = 98)	57
Abb. 18: Beobachtete Interferenzmuster und Farben: Bild 1: Wellenmuster (Muster 3), Bild 2: homogenes Interferenzbild (Muster 4), Bild 3: Interferenzfarben (Muster 5), Bild 4: Mischbild 7 (Wellenmuster/homogenes Muster) Bild 5: Mischbild 8 (homogenes Bild mit Interferenzfarben); Bild 6: Mischbild 9 (Wellenmuster/Interferenzfarben).....	60
Abb. 19: Boxplot zur Darstellung der STT Werte innerhalb der beobachteten Interferenzmuster von allen untersuchten Augen (n= 196, ○ = Ausreißer)	64
Abb. 20: Boxplot zur Darstellung der STT Werte innerhalb der beobachteten Interferenzbilder aller untersuchten Augen unter der Bedingung OD = OS (n= 156, ○ = Ausreißer)	65
Abb. 21: Boxplot zur Darstellung der Meibometriewerte innerhalb der beobachteten Interferenzbilder aller untersuchten Augen (n=112, ○ = Ausreißer)	67
Abb. 22: Boxplot zur Darstellung der Meibometriewerte aller untersuchten Augen unter der Bedingung OD = OS (n= 90, ○ = Ausreißer).....	68
Abb. 23: Darstellung der Interferenzbilder und der Geschlechtsverteilung an n= 196 Augen	70
Abb. 24: Verteilung der STT I – Werte von Hundeaugen, bei denen Meibometrie durchgeführt wurde (n = 112).....	74
Abb. 25: Massenspektrogramm des caninen Meibom Sekrets (A und C) sowie des humanen Meibom Sekrets (B und C) [183]	76
Abb. 26: Prozentuale Veränderung der Meibometriewerte nach 28 Tagen Supplementierung mit essentiellen FS im Vergleich zum Mittelwert aus Tag 1 bis 3 (n=16 Augen)	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung bisheriger Forschungen an der Lipidschicht des Tränenfilms bei versch. Spezies.....	31
Tab. 2: Darstellung der STT I Werte (angegeben in mm/Min) zu den verschiedenen Zeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge und der dazugehörigen Mittelwerte	49
Tab. 3: Darstellung der beobachteten Interferenzbilder zu den verschiedenen Betrachtungszeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge von acht Probanden. (3= Wellenmuster, 4 = homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 9= Wellenmuster/ Interferenzfarben)	51
Tab. 4: Absolute, prozentuale und kumulierte Häufigkeit der beobachteten Interferenzmuster der 16 Augen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (n=80)	52
Tab. 5: Absolute und prozentuale Darstellung der beobachteten Interferenzmuster während der Reproduzierbarkeitsstudie aller untersuchten Augen (n=16)	53
Tab. 6: Darstellung der Meibometriewerte (angegeben in MU =Meibom Units) an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge und der dazugehöriger Mittelwerte von acht untersuchten Hunden	54
Tab. 7: Absolute und prozentuale Geschlechterverteilung aller untersuchten Hunde (n=98) .	58
Tab. 8: Unterteilung aller im Hauptprojekt untersuchten Hunde in vier Untergruppen abhängig von den durchgeführten Untersuchungen	58
Tab. 9: Vorkommen unterschiedlicher Interferenzmuster an der Augenoberfläche bei gesunden 98 Hunden (196 Augen)	61
Tab. 10: Absolute und prozentuale Häufigkeiten bilateral gleicher Interferenzmuster bei n= 78 Hunden.....	61
Tab. 11: Absolute und prozentuale Häufigkeiten bilateral ungleicher Interferenzmuster bei n= 20 Hunden.....	62
Tab. 12: Deskriptive Darstellung der Meibometriemessungen in MU bei n= 56 Hunden	62
Tab. 13: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung des STT I innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	63
Tab. 14: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der meibometrischen Messungen* innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	66

Tab. 15: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung Alters* der Probanden innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	69
Tab. 16: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der Cholesterinwerte (mg/dl) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	71
Tab. 17: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der Triglyceridwerte (mg/dl) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	71
Tab. 18: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung des Schilddrüsenwertes T4 ($\mu\text{g/dl}$) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster	72
Tab. 19: p-Werte der t-Tests für unabhängige Stichproben zwischen den beobachteten Interferenzbildern bezüglich des STT, der Meibometrie, des Alters und der Blutwerte T4, Cholesterin und Triglyceride.....	73
Tab. 20: Ergebnisse des STT I (angegeben in mm/Min) der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf), der Messung an Tag 28 (grau unterlegt) und der Mittelwert aus der Wiederholbarkeitsstudie jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS)	77
Tab. 21: Ergebnisse der Meibometrie (angegeben in Meibom Units, MU) der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf), der Messung an Tag 28 (grau unterlegt) und der Mittelwert aus der Wiederholbarkeitsstudie jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS).....	78
Tab. 22: Darstellung der beobachteten Interferenzbilder der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf) und der Interferenzbilder an Tag 28 (grau unterlegt) jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS).....	79

1 Einleitung

Ein gesunder und stabiler Tränenfilm (TF) stellt einen entscheidenden Faktor für die Aufrechterhaltung der Augengesundheit dar. Er ernährt die avaskuläre Hornhaut, schützt sie mechanisch und immunologisch vor diversen Umwelteinflüssen und optimiert die Lichtbrechung an der Augenoberfläche [1]. In der Humanmedizin ist schon lange bekannt, dass ein Defizit der wässrigen Anteile des dreischichtigen präkornealen TF nicht ausschließlich für eine unzureichende Befeuchtung des Auges und das daraus resultierende Krankheitsbild des „trockenen Auges“ verantwortlich gemacht werden kann [2-6]. Unumstritten ist in diesem Zusammenhang die Relevanz einer intakten Lipidschicht (LS) für den funktionsfähigen TF und somit für die Augengesundheit [3, 4, 6-11]. Ein „trockenes Auge“, welches trotz ausreichender Produktion der wässrigen Phase auftritt, wird als evaporatives „trockenes Auge“ bezeichnet (syn. Evaporative dry eye; EDE) [3, 5]. Das EDE ist durch eine erhöhte Verdunstung und Instabilität des TF u.a. aufgrund einer mangelnden bzw. unzureichenden LS charakterisiert und kann sich klinisch ähnlich einer Keratokonjunktivitis sicca (KCS) präsentieren [3, 5, 11-13]. Von den Meibom Drüsen (MD) am Lidrand gebildet und sezerniert (hier Meibom Sekret, MS), gewährleistet eine physiologische LS die Stabilität des gesamten TF und somit eine ausreichende Befeuchtung der Augenoberfläche [1]. Die LS ist nur wenige Mikrometer dünn und eine komplexe Komposition verschiedener polarer und nicht polarer Fette [14-21]. Die logische Schlussfolgerung ist, dass kleinste Veränderungen in der Zusammensetzung oder ein quantitatives Defizit der LS großen Einfluss auf die Funktionalität des TF haben können.

In der Veterinärmedizin gibt es, auch wenn die LS als relevanter Faktor zumindest in Fachkreisen zunehmend diskutiert wird, weder Informationen über die Morphologie oder Komposition der LS noch ist die durch einen qualitativen Mangel an LS hervorgerufene Form des „trockenen Auges“ in der Fachliteratur beschrieben. Diese Lücke, insbesondere für die Spezies Hund, zu schließen, sollte Inhalt der vorliegenden Arbeit sein.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie des äußeren Auges

Das Auge ist ein empfindliches Sinnesorgan, welches die visuelle Wahrnehmung der Umwelt ermöglicht und zur Kommunikation mit anderen Lebewesen entscheidend beiträgt. Für Mensch und Tier ist der Lichtsinn von großer Bedeutung. Er ermöglicht eine sichere Orientierung. Einfallende Lichtwellen werden vom Auge absorbiert und erzeugen eine Erregung photosensibler Nervenzellen der Netzhaut im Auge. Die Reize werden über den Sehnerv an übergeordnete Zentren im Gehirn weitergeleitet, um schließlich in eine visuelle Wahrnehmung verarbeitet zu werden.

Das Sehorgan (*Organum visus*) kann in drei Untereinheiten eingeteilt werden [22]. Diese sind der Augapfel (*Bulbus oculi*), die Anhangsorgane des Auges (Augenhöhle samt Faszien und Muskeln, Augenlider, Tränenapparat) sowie der Sehnerv (*Nervus opticus*). Die Augen sind in den knöchernen Augenhöhlen (*Orbita*) des Schädels in einem Fettpolster eingebettet. Sie werden vom Ober- und Unterlid (*Palpebra superior und Palpebra inferior*) und bei zahlreichen Tierarten, so auch beim Hund, von dem dritten Augenlid (*Palpebra tertia*) geschützt. Die Bindehäute (*Conjunctivae*) verbinden die Lider mit dem Bulbus [23]. Die vom Tränenapparat produzierte Tränenflüssigkeit schützt die zur Umwelt exponierte Augenoberfläche. Hier wird sie als TF bezeichnet und trägt entscheidend zur Gesunderhaltung des Auges bei.

Der Augapfel des Hundes ist frontal abgeplattet, die Augenachse verläuft beinahe parallel. Diese Anordnung stellt bei jagenden Tieren einen großen Vorteil in der Lokalisation von Beute dar. Der *Bulbus oculi* des erwachsenen Hundes hat je nach Rasse einen Durchmesser von 20 bis 25 mm [24]. Er wird von vier geraden, zwei schrägen Augenmuskeln sowie dem *M. retractor bulbi* bewegt und in Position gehalten. Der Bulbus besteht aus drei Schichten: der äußeren Augenhaut, der *Tunica fibrosa*, der mittleren Augenhaut, der *Tunica vasculosa* (Uvea) und der inneren Augenhaut, der *Tunica interna* oder Retina [22, 25]. Sie bilden die Wandschichten des Bulbus, welcher die vordere Augenkammer, die hintere Augenkammer, die Linse und den Glaskörper beherbergt.

Die *Tunica fibrosa* dient als äußere bindegewebige, formgebende Hülle des Augapfels [22, 25]. Sie besteht aus der Hornhaut (*Cornea*) und der *Sklera*, einer weißlichen Lederhaut, die

den größeren Anteil bildet. Sie geht im vorderen Abschnitt in die sich leicht vorwölbende, transparente Hornhaut über, die als Sehfenster fungiert. Die Kornea des Hundes bildet einen an den Polen minimal abgeplatteten Kreis, dessen Durchmesser im Schnitt 17 mm (ventrodorsal 16 mm) beträgt [24].

Die bis zu siebenschichtige Kornea [1] besitzt ein Grundgerüst aus Kollagenfibrillen und ist von Nervenfasern durchzogen [24]. Beim Hund besitzt sie in der Peripherie eine Dicke von 0,5 bis 0,7 mm und verdickt sich zentral auf 0,8 bis 1,0 mm [26, 27]. Die Transparenz wird durch komplexe Mechanismen und eine geringe Zellzahl gewährleistet. Die äußerste, der Umwelt zugewandte Schicht besteht aus mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel. Die obersten Zellen besitzen feinste Mikrozotten und -villi, die zur Stabilität des aufliegenden TF und optimalen Nährstoffaufnahme beitragen [28]. Das Plattenepithel wird von einer dichteren, Bindegewebsschicht, der Bowman-Membran unterlagert. Bei vielen Haussäugetieren gibt es keine eigentliche Bowman-Membran, jedoch wird beim Rind, beim Hund und bei Labortieren von stark ähnelnden Strukturen berichtet [29]. Die Bowman-Membran besteht aus Kollagenfibrillen und bildet die Grundlage für das Hornhautepithel (*Epithelium anterius corneae*). Dieses stellt eine Barriere für den Einstrom von Wasser in die Kornea und ist für ihre Transparenz besonders wichtig [22]. Ausgestattet mit besonderen Pumpmechanismen sorgt es für einen stets dehydrierten Zustand der Kornea, der sie durchsichtig macht. Die kräftigste Schicht der Hornhaut stellt das Stroma (*Substantia propria*) dar. Dieses macht etwa 90% der Hornhaut aus. Das Stroma ist reich an lamellär angeordneten Kollagenfaserbündeln, die mit einer Kittsubstanz aus Glykoproteinen zusammengehalten werden [30]. Die Zellzahl im Stroma ist sehr gering. Es handelt sich hierbei um Fibroblasten, die für die Produktion der Kollagenfasern zuständig sind. Unter dem Stroma verläuft die Descemetsche Membran, eine elastische Basalschicht aus Kollagenfasern. Die hintere Grenzschicht bildet das Hornhautendothel, eine einlagige Epithelschicht, die gleichzeitig die Innenauskleidung der vorderen Augenkammer bildet [22, 31]. Aus dieser pumpt das Endothel Wasser samt den Nährstoffen in die vorgelagerten Schichten und auch wieder heraus. Die komplexe Regulation des Wasserhaushaltes im Hornhautepithel und -endothel trägt zur Aufrechterhaltung der Transparenz bei.

Die Innervation der Hornhaut erfolgt durch Nervenäste des *Nervus ciliaris longus* sowie des *Nervus ophthalmicus*, die aus der Sklera in die Kornea eintreten. Kleine Ausläufer ragen bis

in die äußerste Schicht des Plattenepithels [31, 32]. Im Gegensatz zur Sklera ist die Kornea avaskulär. Daher ist die Kornea auf einen alternativen Weg der Nährstoffversorgung angewiesen. Die Versorgung mit Metaboliten und Wasser, sowie der Abtransport erfolgt durch Diffusion aus dem aufliegenden TF, der vorderen Augenkammer und dem Randschlingennetz, einem feinen Gefäßnetz des *Limbus corneae*, des Überganges von Sklera zu Kornea [30, 33].

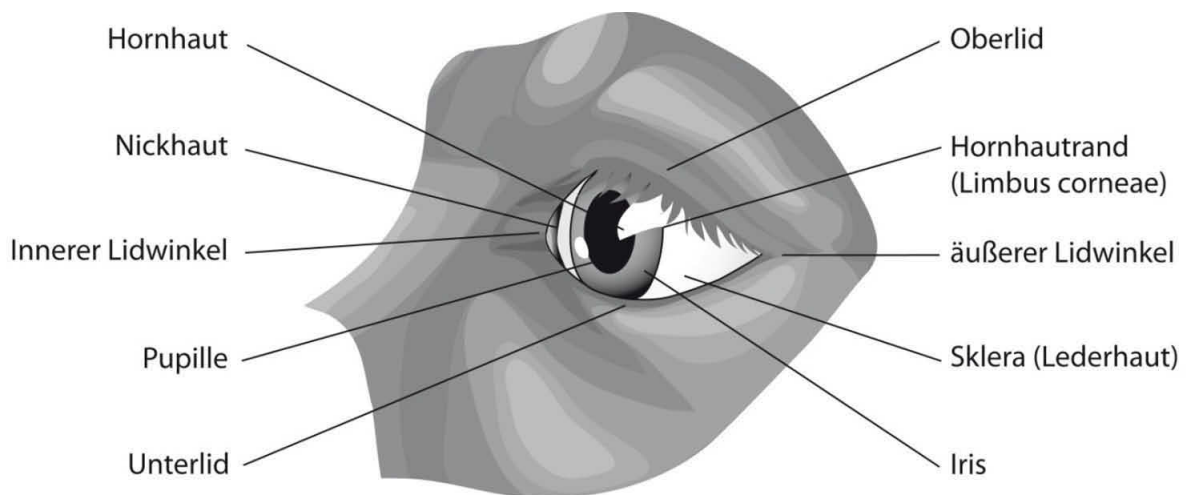


Abb. 1: Schematische Darstellung der anatomischen Gegebenheiten des Hundeauges (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule)

2.2 Anatomie und Physiologie der Augenlider und des Tränenapparats

2.2.1 Augenlider

Die Augenlider sind die äußere, der Umwelt zugewandte Umhüllung der Augen. Sie gewährleisten gemeinsam mit dem präkornealen TF eine kontinuierliche Reinigung und Benetzung der der Umwelt exponierten Augenoberfläche [34]. Sie sind an der Bildung des TF beteiligt, verteilen den TF gleichmäßig über die Kornea, verhindern ihre Austrocknung und schieben Tränen in Richtung des nasalen Kanthus, damit diese über den Tränennasengang ablaufen können [28]. Zudem sind sie ein wichtiger mechanischer Schutz vor Fremdkörpern und äußeren Einflüssen, wie etwa starkes Licht oder Wind. Embryologisch entwickeln sich die Augenlider aus dem Ektoderm (Epidermis, Wimpern und Konjunktiva), aus dem

Neuroderm (tiefere Gewebsschichten, wie Dermis und die Tarsalplatte) und aus dem Mesoderm (Muskulatur der Augenlider). Das Oberlid entsteht bei der Entwicklung des frontonasalen Kopfbereichs, während das Unterlid sich bei der Bildung des Oberkiefers entwickelt [35]. Im Embryonalstadium des Hundes wachsen die oberen und unteren Lider am 32. Tag der Trächtigkeit zunächst zusammen und werden erst 14 Tage nach Geburt wieder geöffnet [28]. Die Lidspalte des ausgewachsenen Hundes ist etwa 33 mm groß, wenn das Auge vollständig geöffnet ist [24]. Die Größe der Lidspalte variiert jedoch von Rasse zu Rasse.

Der Lidschluss erfolgt aufgrund der Kontraktion der tief in den Lidfalten liegenden *Musculi (Mm.) orbiculares oculi*. Zum Öffnen der Lider kontrahiert der *M. levator palpebrae superioris*, welcher an der Tarsalplatte des Oberlids liegt, während sich die *Mm. orbiculares oculi* entspannen [28]. Der Lidschlag des Oberlides (*Palpebra superior*) macht den größeren Anteil des Lidschlusses aus. Der Hund blinzelt im Schnitt 14,2 Mal in der Minute, wobei es bei bis zu 66 Prozent nicht zu einem kompletten Lidschluss kommt [36]. Die Lider des Hundes sind pigmentiert (Ausnahme bei unpigmentierter Haut und weißem Haar) und bis circa einen Millimeter vor dem äußersten Rand sind Ober- und Unterlid des Hundes behaart, wobei die letzte Haarreihe ein wimpernartiges Aussehen besitzt [22]. Wimpern, auch Zilien (*Cilia*) genannt, finden sich beim Fleischfresser nur am Oberlid [28]. Die Umschlagstelle vom äußeren Lid zum inneren Lid ist glatt und unbehaart [22]. Sie wird als Lidkante (*Margo palpebrae*) bezeichnet und unterteilt das Lid in die dem Auge zugewandte, glatte, hintere Kante und die vordere, behaarte Kante. Die hintere Lidkante ist von der Lidbindehaut überzogen und geht in die Bindehaut über. Medial und lateral treffen das Ober- und Unterlid im Augenwinkel aufeinander, wo sich im medialen Augenwinkel eine Drüse, die *Glandula carunculae lacrimalis*, befindet [37]. An der Umschlagstelle von der vorderen zur hinteren Lidkante befinden sich die Ausführungsgänge der MD. Je 20 bis 40 MD befinden sich in der Lidplatte (*Tarsus*) eines Lids [24], wobei im Oberlid mehr MD als im Unterlid zu finden sind [1]. Das dritte Augenlid (*Palpebra tertia*, Nickhaut) ist eine sichelförmige Bindehautfalte im medialen Augenwinkel. Das dritte Augenlid des Hundes besitzt einen hyalinen Knorpel, lymphatische Noduli und die Nickhautdrüse (*Gl palpebrae tertiae*, *Gl membranae nictitans*) [23, 24].

2.2.2 Konjunktiva

Die Konjunktiva (syn. Bindehaut, lat. *Conjunctiva*) ist die bindegewebige Auskleidung der Innenfläche der Augenlider (*Conjunctiva palpebrae*), des Konjunktivalsacks (*Saccus conjunctivae*) und des Augapfels (*Conjunctiva bulbi*). Sie beginnt an der Innenkante der Lider, geht im *Fornix conjunctivae* in die Augenbindehaut über und endet im Bereich des Limbus [28, 38]. Die Bindehaut schützt u.a. das Auge vor dem Austrocknen und ist an der Beseitigung von Erregern und Fremdkörpern beteiligt [38]. Die Konjunktiva lässt sich in das Epithelgewebe und in die darunter liegende *Lamina Propria* einteilen, die aus einer lymphozytenreichen Drüsenschicht und einer tieferen nervenfaser- und blutgefäßreichen Bindegewebsschicht besteht. Im Epithelgewebe befinden sich Becherzellen, die Muzine für die Muzinschicht des TF produzieren [39]. Dabei ist die Verteilung der Becherzellen beim Hund sehr heterogen. Die höchste Dichte befindet sich im nasalen und medialen Fornix des Unterlids sowie in der palpebralen Konjunktiva im Bereich des Tarsus [40].

2.3 Sekretorische Anteile des Tränenapparats

Der Tränenapparat setzt sich bei allen Säugern, so auch beim Hund, aus tränenproduzierenden und -sezernierenden Drüsen sowie den tränenableitenden Wegen zusammen [36]. Die sekretorischen Anteile sind für den präokulären TF zuständig. Die einzelnen Komponenten, die sich auf der Augenoberfläche zum TF vereinen, werden in der Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*), der Nickhautdrüse (*Glandula membranae nictantis superior*), den Meibom Drüsen (*Glandula tarsalis*) sowie den akzessorischen Tränendrüsen (*Glandula lacrimalis accessoria*) gebildet [36]. Die permanent nachgebildete Tränenflüssigkeit sammelt sich im medialen Augenwinkel im Tränensee (*Lacus lacrimalis*). Zentral ragt die Tränenkarunkel heraus. Einige Millimeter entfernt befinden sich an der oberen und unteren Lidkante die Tränenpünktchen (*Puncta lacrimalia*). Durch diese Öffnungen fließt die Tränenflüssigkeit über ein Kanälchen zum Tränensack (*Saccus lacrimalis*). Aus diesem führt der Tränennasengang (*Ductus nasolacrimalis*) knöchern zum Nasenvorhof. Die Austrittsstelle des Tränennasenganges befindet sich einige Millimeter vom ventralen Nasenloch im ventralen Nasengang [37].

2.3.1 Tränendrüse (*Gl. lacrimalis*)

Die *Gl. lacrimalis* befindet sich dorsolateral des Bulbus unterhalb des *Os frontale* [37]. Sie ist eine tubuloalveoläre, seröse Drüse [39]. Ihre Ausführungsgänge münden am dorsotemporalen Lidrand in den Konjunktivalsack [37] (s. Abb. 2).

2.3.2 Nickhautdrüse (*Gl. membranae nictitans*)

Die Nickhautdrüse befindet sich ventromedial des Bulbus im Bereich des Nickhautknorpels. Sie entspricht im Aufbau der Tränendrüse und führt ebenfalls Ausführungsgänge zum medialen Augenwinkel [37] (s. Abb. 2).

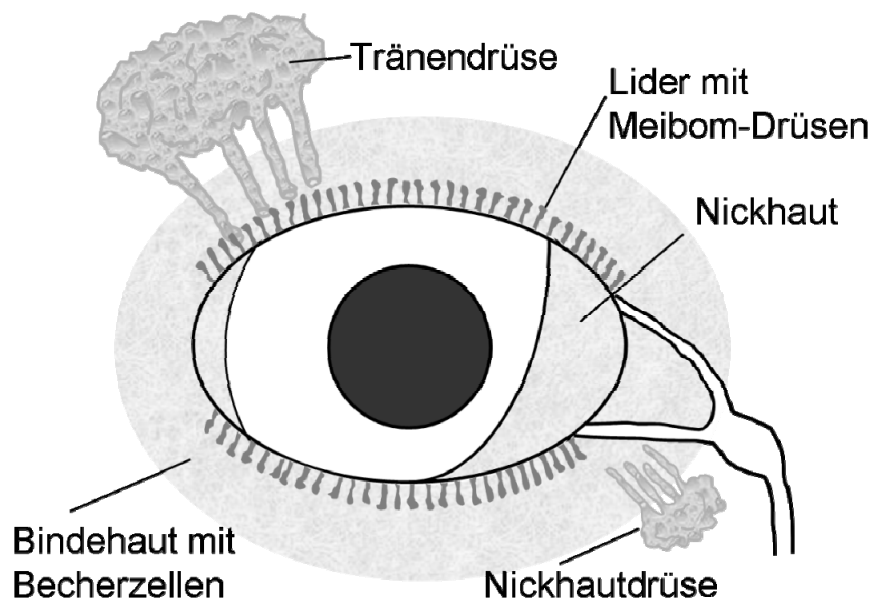


Abb. 2: schematische Darstellung der sekretorischen Anteile am Hundeauge (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule)

2.3.3 Meibom Drüse (*Gl. tarsalis*)

Die Meibom Drüsen (MD) wurden erstmals 1666 vom Medizinprofessor Heinrich Meibom dem Jüngeren beschrieben und nach ihm benannt [41]. Es sind längliche, tubuloazinäre Drüsen, die senkrecht nebeneinander im Ober- und Unterlid angeordnet sind (s. Abb. 2).

Aufgrund ihrer Lokalisation werden sie anatomisch korrekt als *Gll. tarsales* bezeichnet. Sie sind im Bindegewebe der Lidkante fibrös eingebettet [42]. Sie produzieren das MS (auch Meibum genannt), welches den öligen Anteil des präkornealen TF, die LS, darstellt, nachdem es auf die Augenoberfläche sezerniert wurde [43]. Alle terrestrischen Säugetiere besitzen diese Drüsen, wobei sie in der Größe und Anzahl von Art zu Art variieren [1]. Bei marinen Säugern mit Ausnahme des Delphins fehlen die MD [44, 45]. Nagetiere und Hasenartige sezernieren zudem ein öliges Sekret über die Harderschen Drüsen, so dass bei diesen der präkorneale TF eine LS enthält, die aus MS und Harderschem Sekret zusammengesetzt ist [22]. Marine Säugetiere, die einen geringeren Bedarf an wässriger Tränenflüssigkeit haben, sezernieren ein öliges Sekret über die *Gl. lacrimalis* und die Harderschen Drüsen [46, 47] und Reptilien über andere Drüsen vom Harderschen Typ, die eine analoge Funktion am Auge erfüllen [48]. Fische und Vögel haben keine LS produzierenden Drüsen am Auge [1].

Wird das Lid evertiert, können die MD als helle, gelbe Linien erkannt werden, die senkrecht zur Tarsalplatte liegen und durch ein feines Kapillarnetz voneinander getrennt werden [49]. Die Zahl der MD schwankt beim Menschen zwischen 30-40 im Oberlid und 20-30 im Unterlid [7, 24]. Ihre Anzahl ist von der Länge des Lidrandes abhängig. Ebenso gibt es Unterschiede in der Größe der Drüsen selbst. Im zentralen Lidbereich erreichen sie eine Länge von bis zu 10 mm, während sie zum medialen und lateralen Lidrand hin kürzer werden (5-6 mm) [42]. Bei Hunden kann von einer ähnlichen Anzahl der Drüsen ausgegangen werden, während ihre Länge je nach Rasse deutlich kleiner ausfallen kann. Sie sind im Durchschnitt 4 mm lang [38].

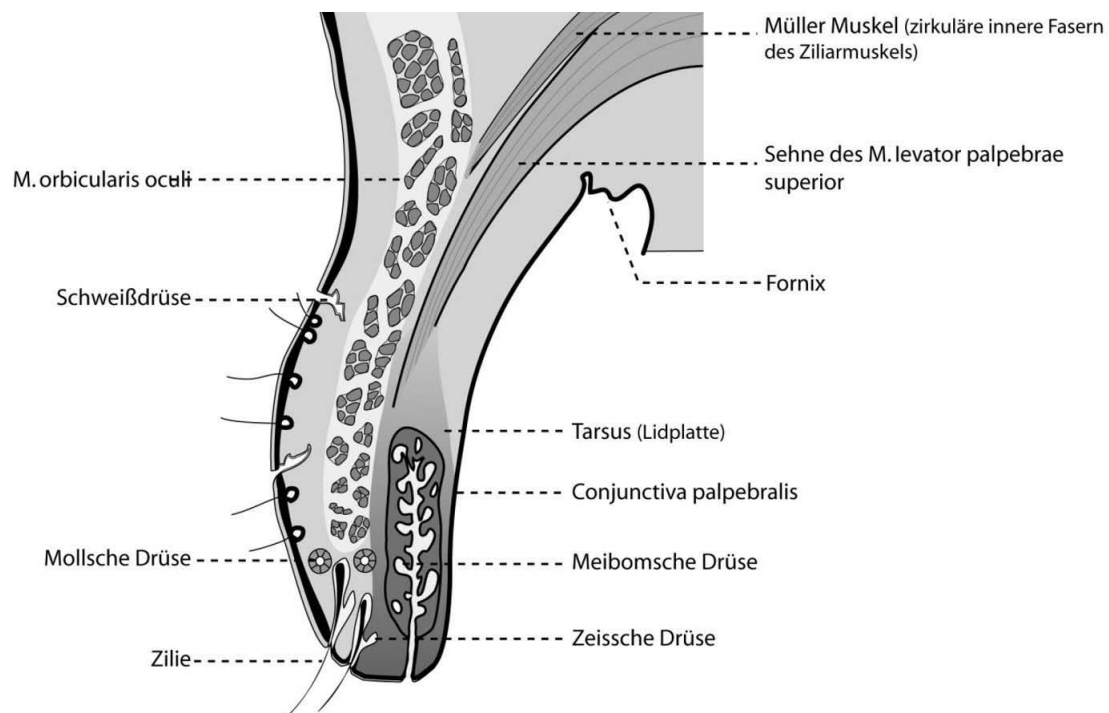


Abb. 3: Schematischer Querschnitt durch das obere Lid des Hundes (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. C. Eule)

Es handelt sich um holokrine Drüsen [39]. Embryologisch sind die MD eng mit den Talgdrüsen der Haut verwandt und entwickeln sich während der Embryogenese aus dem Ektoderm. Die Entwicklung ist der haar-assoziierten Talgdrüsen sehr ähnlich [39]. Die Ausführungsgänge der MD münden auf der Tarsalplatte des Lides in einer flachen Rinne und sind als kleine, perlenartige Punkte am Lidrand zu erkennen [1] (s. Abb. 10). Histologisch zeigen MD des Hundes und des Menschen einen homologen Aufbau. Es sind einfach verzweigte tubuloazinäre Drüsen mit einem zentralen Ausführungsgang, in den aus den beerenförmigen Drüsenendstücken (Azini) kleinere Gänge münden. Die Azini, sowie die Ducti und Ductuli bestehen aus vielschichtigem Epithel. Einzig der distale Bereich des Ausführungsganges zeigt den Charakter eines verhornten Epithels auf [49]. Das Epithel im Bereich der Azini besitzt als Besonderheit eine erhöhte Mitosefähigkeit [39]. Diese Epithelzellen können auch als azinäre Zellen oder Meibozysten bezeichnet werden [19]. Sie durchlaufen eine holokrine Differenzierung. Je nach Reifungsgrad können sie in basale, differenzierte und degenerierte oder hypermature Zellen eingeteilt werden. Dabei sind die degenerierten Zellen dem Lumen am nächsten [50]. Die basalen Meibozysten zeichnen sich durch eine geringe Zahl von intrazellulären Organellen (Ribosomen, Mitochondrien) aus.

Desmosomen binden die basalen Zellen an eine Basallamina. Die differenzierten Zellen präsentieren einen erhöhten Gehalt an glatten endoplasmatischen Reticula (ER). Aber auch andere Organellen, wie Ribosomen, Mitochondrien und raue ER sind in geringer Zahl vorhanden. Desweiteren enthalten sie wenige, etwa 0,5 – 1 µm große mit Lipiden gefüllte Vesikel. Je weiter die azinären Zellen differenziert sind, desto mehr Lipidvakuolen beinhalten sie. Auch die Größe der Vesikel steigt mit dem Reifungsgrad [51]. Sehr weit differenzierte Zellen sind reich an MS enthaltenden Vesikeln. Die Anzahl der Mitochondrien und anderer Zellorganellen hingegen geht deutlich zurück. Während dieses gesteuerten Reifungsvorgangs zerfallen die obersten Zellschichten zum Lumen hin. Sie werden samt ihren Inhalts und aller Zellbestandteile in die Ductuli, den zentralen Ductus und schließlich über die Öffnung sezerniert [49]. So erklärt sich, dass das MS sowohl Lipide der Vesikel beinhaltet, als auch andere Bestandteile der Azinuszellen, wie z. B. die Membranlipide und Proteine. Der gesamte Reifungsprozess eines juvenilen Meibozyten bis zu seiner Sekretion beträgt bei der Ratte in etwa 9 Tage [52]. Die Gefäßversorgung erfolgt durch die Lidgefäße, die bogenartig die Lider durchziehen und neben der Lidmuskulatur auch die MD durchziehen [53].

Die Sekretion erfolgt zum einen aufgrund des Blinkvorganges der Lider. Während des Lidschlusses werden die Lidmuskeln verkürzt und der Inhalt der MD über die Ausführungsgänge ausgepresst [54]. Es sind nicht alle MD eines Individuums aktiv. Beim gesunden Menschen geben nur etwa die Hälfte der Drüsen Sekret ab [55]. Die aktiven Drüsen häufen sich beim Menschen am nasalen Lidrand, die weniger aktiven liegen weiter temporal [56]. Jedoch wird auch in Phasen ohne Lidschluss (z. B. in der Schlafphase oder während der Anästhesie) stets MS sezerniert, was dadurch möglich wird, dass MD einer nervalen und hormonellen Regulation unterliegen [53]. So wurden besonders bei Kaninchen zahlreiche Axone im direkt benachbarten Gewebe gefunden [49]. Hartschuh et al. 1983 [57] und Luhtala et al. 1991 [58] fanden dicht an den MD liegende Nervenäste bei verschiedenen Spezies, so auch beim Menschen. Dabei handelt es sich um Äste des Nervus Trigemini. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass Geschlechtshormone eine entscheidende Rolle bei der Regulation der MD Aktivität spielen. Hervorzuheben ist das männliche Hormon Androgen, da Rezeptoren für Androgen und Enzyme des Androgenstoffwechsels im MD-Gewebe des Menschen, aber auch bei verschiedenen Tierarten, gefunden wurden. Insbesondere in den Azinuszellen und im proximalen Teil des zentralen Ausführungsganges [59, 60].

2.3.4 Akzessorische Tränendrüsen (*Gll. lacrimalis accessoria*)

Zu den akzessorischen Tränendrüsen gehören die in der Konjunktiva gelegenen Drüsen (*Gll. conjunctivales*) und die Tränenkarunkel (*Gl. caruncula lacrimalis*) [28]. Die akzessorischen Drüsen der Konjunktiva sind viel mehr Anhäufungen von Becherzellen, die in der Lage sind, Muzine zu sezernieren [23, 40].

2.4 Morphologie und Physiologie des Tränenfilms

Der präokuläre TF liegt der gesamten, der Umwelt zugewandten Augenoberfläche auf. Zum größten Teil bedeckt er die Kornea, aber auch einen Teil der Sklera und der Konjunktiva. An der Grenzfläche zum Ober- und Unterlid, beim Hund auch zum dritten Augenlid hin bildet sich ein Tränenmeniskus. Der TF gewinnt hier an Dicke. Das gleiche gilt für den medialen und lateralen Kantus [1]. Der TF erfüllt zahlreiche wichtige Funktionen am Auge und ist unabdingbar für die Gesunderhaltung der Augenoberfläche und die Funktionstüchtigkeit des okularen Systems, des Sehens. Ohne den TF würde die Kornea einem raschen Zerfall unterliegen, denn der TF liefert der Hornhaut essentielle Nährstoffe und Sauerstoff zur Kornea und gewährleistet ihr Überleben. Gefäße, die im Allgemeinen die Versorgung von Geweben im Körper übernehmen, befinden sich nur am Limbus. Allerdings reicht die Kapazität dieser Gefäße für die Versorgung der gesamten Hornhaut nicht aus, was die Notwendigkeit eines funktionierenden TF nochmals verstärkt. Desweiteren reinigt der TF das Auge von Schmutz- und Staubpartikeln. Aufgrund seiner Inhaltsstoffe und protektiven, antimikrobiellen und entzündungshemmenden Eigenschaften fördert der TF die Wundheilung der Hornhaut bei Verletzungen. Zudem verhindert er durch seine permanenten Erneuerung das Anheften von Keimen [5].

Der TF des Hundes, aber auch anderer Säuger und des Menschen, wird in den Tränendrüsen (beim Hund von *Gl. lacrimalis*, *Gl. membranae nictans*, Becherzellen der Konjunktiva, Meibom Drüsen) gebildet und auf die Augenoberfläche sezerniert. Die Produktion der Tränenflüssigkeit wird neuroendokrin reguliert [61]. Der Grundbedarf an Tränenflüssigkeit zur Befeuchtung und Ernährung der Augenoberfläche wird durch eine permanente Basalsekretion gedeckt [34]. Sie kann aber auch durch konjunktivale und korneale oder andere Reize (wie Schmerzen) am Auge stimuliert werden. In diesem Fall wird von einer

Reizsekretion gesprochen [24]. Durch den Lidschluss wird die Tränenflüssigkeit über die Hornhaut verteilt. Wolff untersuchte 1946 zum ersten Mal den präokulären TF am Menschen und manifestierte seinen bis heute akzeptierten dreischichtigen Aufbau [62]. Der TF des Auges besteht aus der muzinen, der wässrigen und der Lipidschicht, die jeweils von verschiedenen Drüsen am Auge produziert und sezerniert werden. Er besitzt eine Gesamtdicke von ca. 0,01 mm [38]. Wobei die Angaben, je nach Untersuchungsmethode stark variieren. So geben Prydall und Campbell eine Tränenfilmdicke von 8,0 bis 15,6 μm je nach Tierart an [63]. Für die Gewährleistung seiner Funktion ist es notwendig, dass alle drei Komponenten des TF in der richtigen Zusammensetzung vorhanden sind. Mangelt oder fehlt eine Phase, ist die Stabilität des TF nicht mehr gegeben und er verliert an Funktion [64].

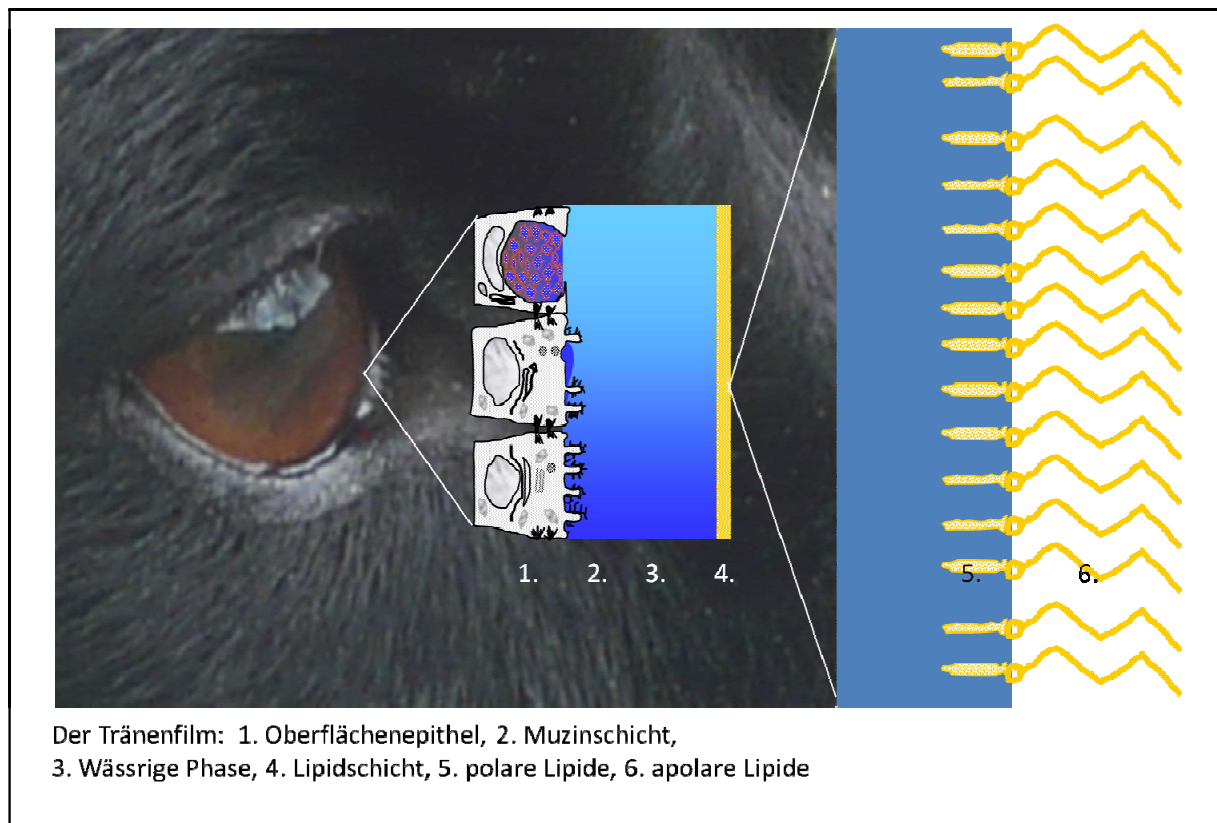


Abb. 4: Dreischichtiger Aufbau des präkornealen Tränenfilms

2.4.1 Muzinschicht

Die muzine Schicht besteht aus großen, stark glykolysierten Glykoproteinen [65]. Ihre Dicke wird von Autoren unterschiedlich angegeben, dabei sprechen alle von einer sehr dünnen

Schicht von ca. 0,20 µm bis 1,00 µm [66]. Sie wird von den akzessorischen Tränendrüsen, den Becherzellen und übrigen Epithelzellen der Konjunktiva gebildet [67]. Die Muzine lassen sich in zwei Kategorien aufteilen. Zum einen in die Glykokalix, deren Dicke 0,20 µm beträgt [66]. Ihre großen Muzine sind in den Mikrovilli der kornealen Epithelzellen verankert. Zum anderen in lösliche Muzine, die eine Art Gelschicht bilden und an der Glykokalix haften [68]. Diese löslichen Muzine sind langgestreckt, miteinander verzweigt und ragen mit ihren freien Enden in die darüber liegende wässrige Phase des TF. Beide Komponenten der Muzinschicht liegen dem Hornhautepithel als etwa 1,00 µm dickes Gel auf [5, 68]. Die Muzinschicht ist dafür verantwortlich, dass die hydrophobe Hornhautoberfläche überhaupt benetzbar wird. Zudem ermöglicht sie die Adsorption von Immunoglobulinen (Ig), insbesondere des IgA, aus der aufliegenden wässrigen Schicht. Frühe Untersuchungen an der Kaninchenkornea ergaben, dass in Abwesenheit des muzinen Belages, die Kornea sich kaum mit Wasser benetzen ließ [1].

2.4.2 Wässrige Phase

Die wässrige Schicht bildet in Menge und Dicke den größten Anteil des TF (nahezu 90%). Sie beträgt etwa 7,00 µm und besitzt beim Hund einen pH-Wert von 7,2 [69] (beim Menschen von 7,4 [70, 71]). Der Hauptanteil wird von der *Gl. lacrimalis* gebildet, etwa 60 % [24]. Daneben ist die Nickhautdrüse (*Gl. membranae nictans*) des Hundes zu etwa einem Drittel an der Produktion der Tränenflüssigkeit beteiligt. Einen geringen Teil der wässrigen Phase produzieren zudem die akzessorischen Tränendrüsen der Augenbindehaut [72]. Diese Phase besitzt neben dem Hauptbestandteil Wasser zahlreiche organische und anorganische, gelöste Stoffe. Natrium und Chlorid machen den größten Anteil der anorganischen Ionen aus. Während Proteine, Glukose, Lysozyme und Lactoferrine und Immunoglobuline (überwiegend IgA und IgG) den organischen Anteil darstellen [73]. Lysozyme wirken bakteriolytisch und erreichen im TF höhere Konzentrationen als in jeder anderen Körperflüssigkeit. Lactoferrine sind eisenbindende Proteine, die bakteriostatische Eigenschaften besitzen [74]. Wachstumsfaktoren sind für trophische Eigenschaften zuständig. Auch finden sich Immunoglobuline, die von Plasmazellen der Tränendrüsen produziert und in die wässrige Schicht sezerniert werden [5]. Zudem beinhaltet die wässrige Schicht zahlreiche Proteine, die am Transport von Lipiden innerhalb des TF beteiligt sein sollen, weil sie die Fähigkeit

besitzen, Lipide zu binden [75]. Ein durchaus interessantes Protein ist auch das Apolipoprotein D, ein Glykoprotein. Zwar ist seine Funktion noch nicht vollends geklärt, aber es hat die Fähigkeit, Phospholipide, Cholesterole und andere Lipide zu binden und könnte dadurch an der Verteilung der Lipide im TF beteiligt sein [76].

2.4.3 Lipidschicht

Die Lipidschicht (LS) ist die äußerste Schicht des dreiphasigen TF und besteht nach aktuellem Wissensstand aus zahlreichen polaren und nicht polaren Lipiden [77]. Da sie die oberflächlichste Schicht darstellt, steht sie mit der Luft bzw. Umwelt in Kontakt und erfüllt wichtige Funktionen [7, 64]. Sie stellt die Entstehung und die Aufrechterhaltung einer optisch glatten Oberfläche sicher, gewährleistet die Stabilität des TF und reduziert das Verdunsten der wässrigen Phase [78-80]. Sie verhindert so einen quantitativen Tränenmangel auf der Hornhaut und die daraus resultierenden Folgen, wie Erhöhung der Osmolarität der beiden anderen Tränenfilmschichten und dadurch eine Schädigung der Augenoberfläche [1, 79]. Sie hemmt einen vorzeitigen Tränenabfluss bzw. das Überlaufen der Tränen (Epiphora) sowie ein Aufweichen der Haut der Lider durch Tränen [7]. Sie dichtet die exponierten Bereiche des Augapfels ab, wenn das Auge z. B. während des Schlafens nicht komplett schließt (Lagophthalmus) [1]. Sie sorgt für ein reibungsloses Gleiten der Lider.

Die LS wird von den MD am Lidrand gebildet und beim Lidschluss über die Kornea verteilt [5]. Aber auch die Moll und Zeis Drüsen am Auge sollen Lipide für die LS synthetisieren [74]. Die Lokalisation der Ausführungsgänge der MD sorgt dafür, dass sich ihr Sekret direkt auf die wässrige Schicht legen kann [1]. Da aber der Weg des Sekrets bis zur Augenoberfläche je nach Spezies einige Millimeter weit sein kann, ist es sinnvoll, zwischen einer Sekretion im eigentlichen Sinne (Produktion der Lipide im Drüsengewebe) und einer Ausschüttung der Lipide in den TF zu unterscheiden [1]. Die Sekretion wird einerseits durch den Sekretionsdruck, also die kontinuierliche Produktion des Sekrets in den MD gewährleistet [81]. Andererseits übt die Lidmuskulatur (insbesondere die Orbicularismuskeln) während des Lidschlags Druck auf die MD aus [82]. Das sezernierte MS sammelt sich zuerst als sogenanntes marginales Reservoir auf der Tarsalplatte und bildet einen Ölstreifen entlang der MD. Von hier aus gleitet es kontinuierlich in den TF über [7]. Die Verteilung über die gesamte exponierte Augenoberfläche erfolgt mithilfe der Augenlider, die beim Lidschluss

Sekret aus dem Reservoir aufnehmen und beim Öffnen im TF verteilen [83]. Während des Schließens der Lider wird die LS auf dem TF wie eine Ziehharmonika komprimiert und zum kleinen Teil mit dem Lipidreservoir am Lidrand vermischt und somit auch erneuert, bevor sie beim Öffnen der Lider wieder ausgedehnt und über den TF verteilt wird [81].

Die LS des TF hat eine Dicke von 0,013 μm bis 0,581 μm [36] und besteht aus mindestens 20 übereinanderliegenden Molekülen [84]. King-Smith et al. geben in einer Studie von 2010 die Dicke der LS beim Menschen mit 0,02 μm bis 0,160 μm an [85]. Sie hat jedoch keinen konstanten Wert. Die aktuelle Dicke der LS ein und desselben Individuums variiert permanent, zum Beispiel abhängig von der Zeit zwischen zwei Lidschlüssen und davon, ob diese vollständig sind oder nicht [7, 86]. Das MS enthält viele verschiedene Lipide. Daneben stellen aber auch Proteine einen Bestandteil des MS dar, deren Anwesenheit sich durch den holokrinen Charakter der MD erklären lässt (s. Kapitel 2.3.3.).

Neben dem Defizit des MS vornehmlich aufgrund von pathogenen Veränderungen, welches für eine vorzeitige Verdunstung der wässrigen Tränenfilmanteile verantwortlich gemacht wird, spielt die Komposition der Lipide eine wichtige Rolle [42]. Bei einer gestörten Zusammensetzung der Lipide kann die LS ihre Funktionen nicht erfüllen, selbst dann, wenn ausreichend MS produziert wird. Bisher gibt es keine Erkenntnisse über die Zusammensetzung des MS des Hundes, wohl aber über die des Menschen sowie zahlreicher anderer Tierarten [14, 16-18, 20, 64, 83, 87-90].

2.4.3.1 Endokrine Steuerung der Lipidproduktion

Geschlechtshormone spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der MD und somit der von ihnen produzierten Lipide [91, 92]. Es sind insbesondere Androgene, Östrogene und Progestine, die an den MD als Antagonisten wirken [93]. Im Gewebe von MD finden sich, wie auch in anderen Talgdrüsen des Körpers Rezeptoren für Androgene [60, 94, 95], Östrogene [96] und Progestine [97]. Das Androgen beeinflusst und fördert entscheidend die metabolische Aktivität der Drüsenzellen sowie die Lipidsynthese [60, 95]. Ein Mangel an Androgen kann entweder aufgrund eines Defizits des Hormons selbst oder aber der Rezeptoren für Androgen auftreten. In beiden Fällen wird beim Menschen eine gesteigerte Keratinisierung der Ausführungsgänge bis hin zur Obstruktion beobachtet [60]. Zudem ändert sich die Zusammensetzung des MS, was einen unphysiologischen TF zur Folge haben kann.

Wie auch auf Talgdrüsen (im Allgemeinen reduziert Östrogen die Talgproduktion) [98] haben Östrogene auch eine negative Wirkung auf die MD, indem sie Gene unterdrücken, die u.a. bei der Biosynthese und Mobilisation von Lipiden beteiligt sind [99]. Ein Überschuss erhöht die Inzidenz des „trockenen Auges“ [9, 91, 92].

2.4.3.2 Nervale Steuerung der Lipidproduktion

Neben der endokrinen Regulation durch Androgene und Östrogene werden die MD im Gegensatz zu anderen Talgdrüsen des Körpers auch neural beeinflusst [100]. In einer Studie an Ratten wurde eine ausgeprägte Innervation durch parasympathische Nervenfasern aus dem *Ganglion pterygopalatinum* sowie eine geringere Innervation durch sensorische Nervenfasern aus dem *Ganglion trigeminale* und sympathische Fasern aus dem *Ganglion cervicale superius* nachgewiesen [101]. Mittels elektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Untersuchungen, konnten auch beim Menschen unmyelinisierte Nervenfasern im Bereich der MD nachgewiesen werden. Sie liegen dicht an den Azini, haben aber keinen direkten Kontakt, was charakteristisch für eine vegetative Innervation ist [49, 100]. Bei der Ratte konnte zudem nachgewiesen werden, dass die vorwiegend parasympathischen Nervenfasern ihren Ursprung im Hirnstamm haben, von wo auch die Tränendrüsen beeinflusst werden [102]. Dieses erscheint sehr logisch, wenn davon ausgegangen wird, dass für die Gesundheit der Augenoberfläche eine optimale Zusammensetzung aller Anteile des TF notwendig ist.

2.4.3.3 Alters- und geschlechtsbedingte Beeinflussung der Lipidproduktion

Inwiefern das Alter und Geschlecht einen Einfluss auf die MD haben, ist bis heute nur zum Teil geklärt [103]. Da die Lipidproduktion hormonell durch Hormone, wie z. B. Androgene beeinflusst wird [60], haben Männer im Durchschnitt eine höhere Sekretion des MS als Frauen [104]. Erst in höherem Alter (ab ca. 60 Jahren) gleicht sich die Produktion des MS bei beiden Geschlechtern an, da bei Frauen die Aktivität der Östrogene mit zunehmendem Alter nachlässt [5, 91, 92]. Zudem lässt im Alter die Aktivität der MD generell nach [55]. Auch an Mäusen konnte eine altersabhängige Veränderung der MD festgestellt werden [105].

2.5 Tränenfilm betreffende Erkrankungen des Hundeauges

In der Veterinärophthalmologie wird bis heute den MD und der LS als möglicher Faktor von Augenerkrankungen nur relativ wenig Beachtung geschenkt. Eine veränderte LS oder gar ein Lipidmangel als Ursachen für das Krankheitsbild des „trockenen Auges“ beim Tier wird in der veterinärmedizinischen Fachliteratur kaum erwähnt. In der Humanmedizin hingegen sind Augenerkrankungen, die auf einer veränderten, mangelnden oder gar fehlenden LS als pathogenen Faktor beruhen bekannt und weitgehend untersucht [8, 49, 83, 84, 106, 107], auch wenn noch nicht alle Pathomechanismen, die die MD und die LS steuern vollständig geklärt sind [108]. Dabei muss in Anbetracht der zahlreichen Studien aus der Humanmedizin auch beim Tier (und insbesondere beim Hund) neben dem bisher anerkannten, quantitativen Tränenmangel (hypovolämisches „trockenes Auge“) auch ein qualitativer Tränenmangel (hyperevaporatives „trockenes Auge“) in Betracht gezogen werden.

Das Syndrom des „trockenen Auges“ im klassischen Sinne (Keratokonjunktivitis sicca; KCS) ist eine ernstzunehmende Augenerkrankung und hat in der Veterinärmedizin, wie auch in der Humanmedizin, eine hohe Relevanz [5, 6, 13, 83, 109, 110]. Die Ursachen sind vielfältig, haben jedoch stets einen quantitativen Tränenmangel zur Folge, der zu klinischen Augenveränderungen führt [5, 6, 111]. Neben der Prädisposition bestimmter Hunderassen (West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier [112]) werden beim Hund, wie auch beim Menschen Allgemeinerkrankungen (wie z. B. Diabetes mellitus, Hypothyreose, Morbus Addison) in Zusammenhang mit der KCS gebracht [113]. Alter, Geschlecht, Hormonstatus und Blutfettwerte haben Einfluss auf die Prävalenz des „trockenen Auges“ [9, 95]. Die Symptome können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und reichen von mildem Juckreiz, Rötung und Reizgefühl der Augen bis hin zu hochgradigen Entzündungen der Hornhaut und der vorderen Augenabschnitte (Konjunktivitis, Blepharitis, Uveitis). Je länger der Tränenmangel undiagnostiziert bleibt, desto mehr kann die Hornhaut in Mitleidenschaft gezogen werden. In diesem Fall präsentiert sich dem Ophthalmologen ein chronisch entzündetes Auge, häufig mit mukös schleimigem Ausfluss und Belegen auf der Hornhaut, die selbst entzündet (Keratitis), teils oder gar vollständig pigmentiert und mit Gefäßen überzogen sein kann [109]. Eine nicht behandelte KCS des Hundes ist höchst schmerzhaft und kann den Visusverlust zur Folge haben. Aktuell steht nur der Schirmer Tränen Test (STT) als semiquantitatives Diagnostikum zur Feststellung eines quantitativen Tränenmangels zur

Verfügung. Ein qualitativer Tränenmangel bleibt in der Veterinärmedizin bislang undiagnostiziert.

2.5.1 Hyperevaporatives „trockenes Auge“

Das evaporative „trockene Auge“ (engl. evaporative dry eye; EDE) ist eine Benetzungsstörung der Augenoberfläche aufgrund einer vorzeitigen Verdunstung der wässrigen Anteile des TF [7]. In diesem Fall ist die quantitative Produktion der wässrigen Anteile des TF zwar ausreichend, es besteht aber ein als qualitativ bezeichneter Tränenmangel, der Symptome des „trockenen Auges“ auslösen kann [11]. Das EDE kann als Folgegeschehen bzw. Sekundärerkrankung angesehen werden, die auf Primärerkrankungen wie der Dysfunktion der Meibom Drüsen (MGD, s. Kap. 2.5.3.) beruht [107, 111]. In der Humanmedizin ist diese Form des „trockenen Auges“ gut untersucht. Studien belegen, dass es einen engen Zusammenhang zwischen LS, MGD und dem „evaporativen trockenen Auge“ gibt [1, 4, 114, 115]. Über 75 % der Patienten mit quantitativem Tränenmangel haben eine Störung in der LS [116, 117]. Beim Hund sind diese Zusammenhänge noch nicht hinreichend geklärt, was mit dem Mangel ausreichender Untersuchungen zu begründen ist. Dennoch wird aufgrund neuer histologischer Studien an Lidgeweben von Hunden auch beim Hund die MGD vermutet [118, 119]. An Kaninchen wurde bereits gezeigt, dass es zu Symptomen des „trockenen Auges“ kommt, nachdem die MD experimentell verschlossen wurden [120].

2.5.2 Meibomitis/Blepharitis

Eine Erkrankung der Augenlider kann zu einer mangelnden oder veränderter LS führen, wenn die MD in Mitleidenschaft gezogen werden, wie es bei einer Blepharitis oder Meibomitis der Fall sein kann. Die Meibomitis ist die Entzündung der MD. Sie kommt selten als alleinige Erkrankung vor, viel häufiger wird sie gemeinsam mit einer palpebralen Konjunktivitis oder einer Blepharitis diagnostiziert [121]. Die Blepharitis ist die Entzündung der Augenlider, wobei zwischen einer anterioren und posterioren Blepharitis unterschieden wird.

Von einer anterioren Blepharitis wird dann gesprochen, wenn es zu Entzündungen der äußeren Lidkante, also vielmehr der Haut dieses Areals kommt, weshalb es sich auch im eigentlichen Sinn um eine Hauterkrankung handelt. Sie hat eine erhöhte Lipidproduktion der

Talgdrüsen zur Folge, aber weniger Einfluss auf die MD selbst (seborrhische Blepharitis) [122]. Die posteriore Blepharitis hingegen ist stark mit den MD assoziiert und wird auch oft als Synonym für die im nächsten Kapitel beschriebene Meibom Drüsen Dysfunktion verwendet [53]. Sie führt unbehandelt zur Obstruktion der MD, zur Verhornung der die Ausführungsgänge auskleidenden Epithelien sowie zur Verdickung des Sekrets. Schlussendlich kommt es aufgrund einer reduzierten Lipidsynthese zu einem Mangel der Lipidphase [122]. Sowohl die Blepharitis als auch die Meibomitis treten besonders häufig bei jungen Tieren auf und sind meist parasitär (Demodex/ Sarcoptes) oder mikrobiell (Staphylokokken/ Trichophyton oder Mikrosporum) bedingt. Auch bei KCS Patienten sind die Augenlider und MD oft mit betroffen [121].

2.5.3 Meibom Drüsen Dysfunktion

Eine Funktionsstörung der MD kann verheerende Folgen für die Augengesundheit zur Folge haben. Bei der Erkrankung Meibom Drüsen Dysfunktion kommt es zu Veränderungen der MD aufgrund vielfältiger Ursachen mit verschiedenen starken klinischen Symptomen, wobei die Obstruktion der Ausführungsgänge die gravierendste Komplikation ist [43, 81]. Im englischen Sprachgebrauch wird dieser Krankheitskomplex als „Meibomian gland dysfunction“ bezeichnet [83]. 2011 wurde im Report zum TFOS (*Tear Film & Ocular Surface Society*) *Workshop on Meibomian Gland Dysfunction* eine passende Definition dieser Erkrankung veröffentlicht [123]:

„Meibomian Gland Dysfunction (MGD) is a chronic, diffuse abnormality of the meibomian glands, commonly characterized by terminal duct obstruction and/ or qualitative/ quantitative changes in the glandular secretion. It may result in alteration of the tear film, symptoms of eye irritation, clinically apparent inflammation, and ocular surface disease.“

Die häufigste Ursache für die dauerhafte Veränderung der Drüsen ist die posteriore Blepharitis, weshalb die MGD oft als Synonym verwendet wird [81]. Die Folge ist unabhängig von der Ätiologie eine erhöhte Verdunstung der wässrigen Anteile des Tränenfilms, da unzureichend MS produziert wird [7, 124, 125]. Je nachdem, wie viele MD

ihre Funktion nicht mehr erfüllen, können keine bis sehr deutliche Symptome auftreten. Die Erkrankung hat zwei Pathomechanismen, die zahlreiche Folgereaktionen mit sich bringen. Der eine Pathomechanismus führt zu Entzündungsanzeichen an der Augenoberfläche. Die aus dem Lipidmangel resultierende erhöhte Evaporation der wässrigen Anteile des TF führt im verbleibenden TF zu einer erhöhten Konzentration der darin gelösten Salze, die Osmolarität des TF steigt. Diese Hyperosmolarität führt zur Aktivierung antiinflammatorischer Mediatoren der Hornhaut und Bindehaut. Es kommt zur typischen Symptomatik. Die Augen sind gereizt, brennen und fühlen sich trocken an. Der zweite Pathomechanismus beeinflusst die MD selbst [126]. Sind die Ausführungsgänge der Drüsen verstopft, kommt es zu einer Stase des produzierten Sekrets. Es sammelt sich in den Gängen der MD, übt Druck auf diese aus und führt letztendlich zu einer Dilatation der Ductuli. Durch den Rückstau kommt es zwangsläufig zu einer Druckatrophie des Drüsengewebes, welches nach und nach durch verhornte Epithelzellen ersetzt wird. Gehen Gewebe und Anteile des MD zugrunde, wird von „Gland dropout“ gesprochen [81]. Es können aber auch Funktionsstörungen der MD auftreten, ohne dass eine Veränderung im Drüsengewebe nachgewiesen werden kann. In diesem Falle treten lediglich klinische Symptome an der Augenoberfläche auf, die einen Hinweis auf eine MGD geben. Zwar ist diese Erkrankung beim Hund noch nicht beschrieben, aber jüngste histologische Untersuchungen der MD beim Hund zeigten, dass auch beim Hund Veränderungen an den MD vorzufinden sind, die in der Humanmedizin in Zusammenhang mit der MGD gebracht werden [118]. Ob eine MGD beim Hund im gleichen Maße auftritt wie beim Menschen und wenn ja, ob sie mangels entsprechender Diagnostik nicht erkannt wird, ist z.Zt. noch nicht hinreichend geklärt.

2.6 Diagnostika zur Untersuchung des Tränenfilms

Das „trockene Auge“ ist in der Humanmedizin eine häufige, besonders im Alter auftretende Augenerkrankung, die mithilfe etablierter Untersuchungsverfahren gut untersucht, diagnostiziert und therapiert werden kann [127]. Die Veterinärmedizin konnte insbesondere für die Anwendung am Kleintier (v.a. Hund und Katze) einige dieser Diagnostika übernehmen, wobei einzig der Schirmer Tränen Test im Praxisalltag Verwendung findet [128, 129]. Im Folgenden werden die wichtigsten Diagnostika beschrieben.

2.6.1 Spaltlampenbiomikroskopie

Die vor genau 100 Jahren in die Augenheilkunde eingeführte Spaltlampenuntersuchung ist heute sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärphthalmologie eines der wichtigsten diagnostischen Werkzeuge. Eine Spaltlichtquelle verbunden mit einem Mikroskop ermöglicht das stereoskopische detaillierte Betrachten des vorderen Augenabschnittes bei sechs bis dreißig-facher Vergrößerung. Die Spaltlampe gibt es als fest montierte Tischeinheit, oft verbunden mit einem Tonometer und einer Kamera, die besonders in der Humanmedizin verwendet wird oder als mobile Handspaltlampe (z. B. SL-15, Kowa, Tokio, Japan), die für den Gebrauch am Tier bestens geeignet ist. Zwar kann mit einer Spaltlampe ein direkter Tränenfilmmangel nicht diagnostiziert werden, mögliche Veränderungen an den Augenlidern (insbesondere MD), an den Bindehäuten oder an der Hornhaut, geben dem Untersucher aber Hinweise darauf, dass eine tränenfilmbedingte Erkrankung am Auge vorliegen kann.

2.6.2 Schirmer Tränen Test

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin ist der Schirmer Tränen Test (STT) das gebräuchlichste Diagnostikum, um einen quantitativen Tränenmangel am Auge zu diagnostizieren [2]. Es ist ein leicht durchführbarer nichtinvasiver, semi-quantitativer Test. Er beruht auf dem physikalischen Prinzip der Adhäsion. Dabei wird ein geeichter Filterpapierstreifen (Lackmuspapier) am unteren Konjunktivalsack eingelegt. In einer bestimmten Zeit (i.d.R. 1 Minute) wird Tränenflüssigkeit aufgenommen, die Rückschlüsse auf die Tränenproduktion am Auge zulässt. Erstmals wurde dieser Test 1903 von Otto Schirmer beschrieben, der zum Messen der Tränenmenge am menschlichen Auge ein 25 mm x 5 mm großes Stück Filterpapier verwendet hatte [130]. 1961 war der Schirmer Tränen Test standardisiert erhältlich [131]. Heute ist dieser Teststreifen 35 mm x 5 mm lang, besitzt eine Millimeterskala, ein rundes Ende mit einer Kerbe für das einfache Einsetzen, sowie oftmals einen Farbstoff, der einerseits als Indikator für den stattfindenden Tränenfluss, andererseits zum vereinfachten Ablesen des Messergebnisses dient. Zwischen 1960 und 1975 erschienen zahlreiche Studien zur Anwendung des Schirmer Tränen Tests am Hund, so dass dieser heute in der Veterinärmedizin etabliert ist. Die Referenzwerte für die normale Tränenproduktion des Hundes schwanken in der Literatur, man kann jedoch Werte von 15 mm/min – 25 mm/min als physiologisch betrachten [72, 128, 129]. Werte von weniger als 10 mm/min sind bei

gleichzeitigen Symptomen ein Hinweis für eine KCS beim Hund, ein Schirmer Tränen Test Ergebnis von weniger als 5 mm/min diagnostiziert das hypovolämische „trockene Auge“ [28].

2.6.3 Tränenfilmaufrisszeit

Ist die Muzin- oder LS in ihrer Komposition gestört oder fehlt sie, kann die Stabilität der anderen Schichten des TF nicht mehr gewährleistet werden, Symptome des „trockenen Auges“ können entstehen [132]. So fließt der TF schneller ab und der wässrige Anteil verdunstet zudem vorzeitig. Als Folge ist der präokuläre TF nicht länger stabil und „reißt“ auf. Zwar bricht der TF auch dann auf, wenn er physiologisch ist, nur dauert es deutlich länger als wenn Funktionsstörungen wie ein Muzin- oder Lipidmangel vorliegen. In der Humanmedizin gehört die Tränenfilmaufrisszeit (engl. Tear film breakup time; TFBUT) zu den gängigen Diagnostika des „trockenen Auges“ [2]. Aber auch zahlreiche veterinärmedizinische Studien haben die Anwendbarkeit beim Tier überprüft [40, 69, 133-135]. Als praxistaugliches Diagnostikum konnte dieser Test jedoch noch nicht etabliert werden, was wohl auch auf den Mangel an ausreichenden Studien und Informationen über den qualitativen Tränenmangel des Hundes zurückzuführen ist [11]. Die TFBUT ist ein nichtinvasives diagnostisches Verfahren, welches indirekt Aussagen zur Muzinschicht und/oder LS zulässt [2, 11]. Die Informationen über die genaue Durchführung dieses Tests am Tier, insbesondere am Hund, schwanken oder wurden nicht hinreichend dokumentiert, wobei das Prinzip stets das gleiche ist [40, 133, 136]. Es wird die Zeit gemessen bis der TF an Stabilität verliert und aufbricht. Um dieses zu ermöglichen, kann der TF mit einem Farbstoff (i.d.R. Fluoreszein) sichtbar gemacht werden. Nachdem das Fluoreszein appliziert und durch mehrere Lidschläge ausreichend verteilt wurde, wird ab Beginn der Zeitmessung das Auge manuell offen gehalten und der TF mithilfe einer Vergrößerung und Lichtquelle mit Blaufilter beobachtet bis sich schwarze Areale (z. B. in Form von Punkten) in dem Fluoreszein gefärbten TF zeigen. Diese implizieren den Zeitpunkt des Aufreißens [40]. Moore et al. legten 1987 die Zeit bis zum Aufreißen beim Hund auf $19,7 \pm 5$ s fest [40]. Spätere Studien erweiterten die Zeitspanne von 10 – 35 s [135].

2.6.4 Interferometrie

Die Interferometrie ist in der Ophthalmologie ein etabliertes, nichtinvasives Verfahren zur Beurteilung der Tränenfilmstabilität und insbesondere der LS sowie seiner Dicke [86, 137-140]. Das Prinzip, welches dabei genutzt wird, beruht auf dem physikalischen Phänomen von Interferenzen, die auftreten, wenn Lichtwellen an Grenzflächen dünner, transparenter Schichten unterschiedlich reflektiert werden. Abhängig von der Wellenlänge des reflektierten Lichts werden auf der betrachteten Oberfläche Farben und Muster sichtbar (ähnlich der Farben auf einer Seifenblase oder eines Ölteppichs auf der Meeresoberfläche), die eine Aussage über ihre Dicke zulassen [141]. Erste interferometrische Beobachtungen am TF des Menschen wurden bereits 1921 von Alfred Vogt durchgeführt [142]. Von 1969 bis heute folgten zahlreiche Studien, die sich mit der Beurteilung von Interferenzen am TF und der Entwicklung neuer auf diesem Prinzip beruhender Methoden beschäftigen [137, 143]. Der medizinische, aber auch wirtschaftliche Antrieb für die Weiterentwicklung dieses Untersuchungsverfahrens bestand darin, am Menschen die Tränenfilmqualität beurteilen und die Kontaktlinsenanpassung optimieren zu können [138, 144, 145]. Eines zu diesem Zwecke von der Firma Keeler in Zusammenarbeit mit Dr. Guillon entwickelte Gerät ist das Tearscope-plus® [138]. Durch seine spezielle Weißlichtquelle (Synonym Weißlichtinterferometrie) sind Interferenzfarben und -muster des präkornealen TF besonders gut sichtbar. Je nach Interferenzbild können Rückschlüsse über die Stabilität und Dicke der LS gezogen werden und der Verdacht eines „trockenen Auges“ oder die gute Toleranz für das Tragen von Kontaktlinsen bestätigt werden [138, 146]. Hilfreiche Übersichtstabellen mit Abbildungen der möglichen Farben und Muster als Poster oder im Handbuch des Tearscope-plus® erlauben in der Humanmedizin den praxistauglichen und einfachen Gebrauch sowie eine zuverlässige Beurteilung [147].

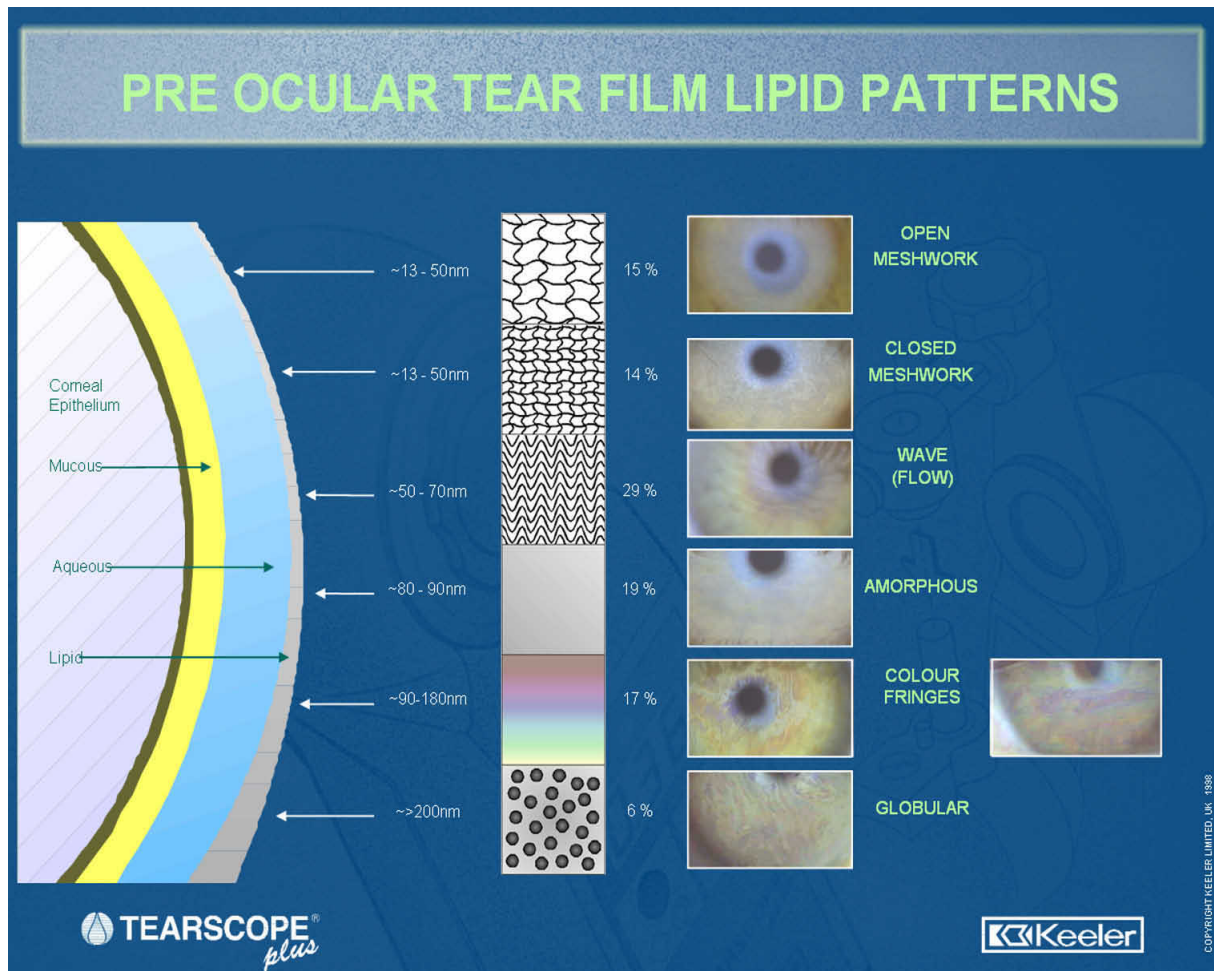


Abb. 5: Übersichtstafel zur Beurteilung der Lipidschichtdicke am menschlichen Auge (Quelle Fa. Keeler)

Carrington, Guillon et al. untersuchten bereits 1987 bei ihren Studien zur KCS des Hundes an 24 Tieren die Möglichkeit, die Interferometrie auch zur Diagnostik am Hundeaugen zu nutzen [36, 109]. Dabei konnte die Tränenfilmmorphologie des Hundes mittels Interferometrie in drei Kategorien eingeteilt werden: 1. fließendes Wellenmuster, wobei gelegentlich auch amorphe Bereiche sichtbar waren. 2. ein irreguläres inselartiges Interferenzmuster. 3. ein als granitähnlich bezeichnetes Interferenzmuster [36]. Zu diesem Zeitpunkt war das Tearscope-plus® noch nicht entwickelt, weshalb ein anderes Interferometer Verwendung fand [148]. Das Tearscope-plus® wurde 1998 entwickelt [138]. Es ist ein relativ kleines, leichtes Gerät, welches ähnlich einer Lupe in einer Hand frei gehalten und daher auch am Hund angewendet werden kann. Zur Untersuchung der Tränenfilmqualität bedarf es weder ein Berühren der Augen noch Augentropfen. Ein Projekt der Freien Universität belegt, dass die Untersuchung

von Hunden sehr gut geduldet wird [149]. Bis dato fehlen jedoch ausreichende klinische Studien zum Tearscope-plus®, die eine Aussage über die Qualität der caninen LS, die Praktikabilität des Gerätes und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zur Diagnose des „trockenen Auges“ am Hund zulassen würden.

2.6.5 Meibometrie

Wenn nicht ausreichend MS (z. B. aufgrund einer MGD) produziert und sezerniert wird, kann ein qualitativer Tränenfilmmangel entstehen, da sich keine funktionstüchtige LS aufbauen kann. Ein EDE kann die Folge sein [11]. Für die semiquantitative Beurteilung des produzierten MS am Auge existiert ein bereits in der Veterinärmedizin etabliertes Verfahren [150-152]. Die Meibometrie ist die quantitative Messung des Lipidgehalts am Lidrand (im sogenannten Reservoir) beruhend auf der Photometrie [54]. Dazu sind mehrere Schritte notwendig. Vor der photometrischen Messung wird MS entnommen. Eine aus saugfähigem Kunststoff gefertigte Folie (in Form einer Schlaufe/eines Stempels) wird für wenige Sekunden direkt dort an den Lidrand gehalten, wo sich die Öffnungen der MD befinden [150, 151]. Die Folie nimmt das Sekret auf. Folglich wird sie an der Stelle, an der sich nun das ölige Sekret befindet, transparent. An einer speziell zu diesem Zwecke entwickelten Messeinheit, dem Meibometer MB 550 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Köln, Germany), werden im letzten Schritt die photometrischen Messungen an der Folie vorgenommen. Das Meibometer, verbunden mit einem PC, wandelt mittels einer Software die photometrischen Daten in Meibometer Einheiten (meibometer units, MU) um, die als Peaks in einem Diagramm erscheinen und Aussagen über eine ausreichende oder mangelnde Meibum-Produktion zulassen [150].

2.7 Lipide und aktueller Wissenstand zur Lipidschicht des Tränenfilms

2.7.1 Lipidgruppen

Bisher wurden im MS des Menschen und verschiedener Tiere sowohl polare als auch nicht polare Lipide gefunden [14, 84, 87, 88, 153-156]. Es ist wichtig zu verstehen, dass es sich bei den beiden Gruppen der Lipide eher um Fettfamilien handelt und es innerhalb einer Familie

zahlreiche Variationen gibt, die u.a. durch zahlreiche exogene (z. B. Luftfeuchtigkeit, Temperatur) und endogene (Sexualhormone, Medikamente, Alter) Faktoren beeinflusst werden [6, 9, 46, 59, 99, 108, 157]. Daraus folgt, dass die LS in ihrer Komposition von Spezies zu Spezies und Individuum zu Individuum geringfügig variieren [21, 34].

2.7.2 Fettsäuren

Fettsäuren (FS) stellen einen Bestandteil der Lipide dar und sind für die Eigenschaften der Fette verantwortlich. FS bestehen aus Kohlenwasserstoffen, die zu einer Kette angeordnet sind und die mit einer Carboxylgruppe endet [158]. Die Carboxylgruppe selbst ist wasserlöslich (hydrophil) [84]. Da die Kohlenwasserstoffketten eine unterschiedliche Länge besitzen können, erfolgt die Nummerierung der Kohlenstoffe von der Carboxylgruppe aus. In biologischen Systemen variiert die Zahl der Kohlenstoffe zwischen 14 und 24. Es handelt sich zumeist um gerade Zahlen mit einem Schwerpunkt auf 16 und 18, was in der Biosynthese der FS begründet ist [158]. Je mehr Kohlenwasserstoffe eine FS besitzt, desto hydrophober bzw. lipophiler wird sie [84]. Auch können FS eine unterschiedliche Anzahl von Doppelbindungen aufweisen. Diese können sowohl in der cis- als auch trans- Konfiguration vorliegen, wobei die cis-Konfiguration überwiegt. Eine FS, die Doppelbindungen besitzt, wird als ungesättigt bezeichnet, eine ohne Doppelbindungen als gesättigt. Die Nomenklatur der FS wird nebst der Zahl der Kohlenstoffe (C) auch von der Zahl der Doppelbindungen bestimmt. Eine FS mit 18 Kohlenstoffen ohne Doppelbindungen (C_{18} -FS) zum Beispiel wird Octadecansäure genannt. Eine FS mit einer Doppelbindung hat die Endung -ensäure (z. B. Octadecensäure), eine mit zwei Doppelbindungen die Endung -diensäure (z. B. Octadiensäure), usw. Die Zahl der Doppelbindungen kann auch symbolisch dargestellt werden. So bedeutet das Symbol $C_{n,0}$, dass die FS mit n C-Atomen keine Doppelbindung besitzt. Das Symbol $C_{n,2}$ bedeutet, dass die FS mit $C=n$ zwei Doppelbindungen besitzt. Um darauf hinzuweisen, an welchem Kohlenstoff in der Kette die Doppelbindung vorliegt, wird das Symbol Δ angegeben, gefolgt von der Position des Kohlenstoffes in der Kette, unter Angabe der Konfiguration der Doppelbindung. Z. B.: $cis\Delta^8$, nach dem achten C-Atom (ausgehend von der Carboxylgruppe als C1) folgt eine Doppelbindung in der cis-Konfiguration. Eine zweite Möglichkeit, auf eine Doppelbindung hinzuweisen liegt darin, die Kohlenstoffe der FS vom distalen Ende her zu zählen. Das distale

C hat die Bezeichnung ω . Eine ω -3-FS ist demnach eine FS, die die Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom von distal gezählt besitzt [158].

Die Eigenschaften einer FS hängen u.a. von der Kettenlänge und der Zahl der Doppelbindungen ab. So haben ungesättigte FS einen niedrigeren Schmelzpunkt als gesättigte FS der gleichen Länge. Ebenso haben FS kürzerer Kettenlänge einen niedrigeren Schmelzpunkt als längere [158]. Je kürzer die FS und je mehr Doppelbindungen, desto höher ist die Fluidität [158]. Besitzen FS Doppelbindungen, werden sie daran gehindert, um sich herum zu rotieren und sich dicht aneinander zu legen. Um eine gleichmäßige Schicht zu bilden (wie es bei der LS auf der wässrigen Phase des TF der Fall ist), ist es aber von Vorteil, wenn die FS zahlreiche Doppelbindungen besitzen. FS zeigen durch ihren hydrophilen Anteil (Carboxylgruppe) und ihre Hydrophobie (Kohlenwasserstoffkette) einen amphiphilen Charakter. Dieses ermöglicht den FS, eine Schicht zwischen einem wässrigen und einem fettigen Medium aufzubauen. In biologischen Systemen werden solche Moleküle als grenzflächenaktive Substanzen (engl. Surfactant) bezeichnet [84].

2.7.3 Wachse

Wachse zählen zu den Lipiden. Ihre Hauptkomponenten sind Fettsäureester mit primären, langkettigen Alkoholen, den sogenannten Wachsestern. Obwohl die Esterbindung hydrophil ist, sorgt die Kohlenwasserstoffkette des Wachses dafür, dass diese Lipide sehr hydrophob sind [84].

2.7.4 Phospho-, Sphingolipide, Cerebroside

Phospholipide (PL) sind aus vier Komponenten zusammengesetzt: aus einer oder mehreren FS, einer „Plattform“ (dabei handelt es sich häufig um Glycerin, einen Alkohol, oder bei Sphingolipiden um ein Sphingosin), an die die FS gebunden sind, einer Phosphatgruppe und einem Alkohol (auch als phosphorylierter Alkohol bezeichnet). Die FS und der Alkohol bilden den hydrophoben Teil des PL. Die Phosphatgruppe und der Alkohol verhalten sich hydrophil. Sphingolipide haben einen ähnlichen Aufbau, denn Sphingosin ist chemisch betrachtet ein Aminoalkohol. Cerebroside sind Glycosphingolipide [158].

2.7.5 Cholesterol

Cholesterol (Cholesterin) ist ein Steroid, welches aus vier Kohlenstoffringen zusammengesetzt ist. An einem Ende des Ringgerüsts befindet sich eine Kohlenwasserstoffkette, am anderen Ende die Hydroxylgruppe [158]. Aufgrund des Steroids und der Kohlenwasserstoffkette ist Cholesterol stark hydrophob [84]. In biologischen Membranen ist es parallel zu den PL ausgerichtet. Die Hydroxylgruppe interagiert mit den hydrophilen Anteilen der PL [158].

2.7.6 Glycerole, Hydrocarbone

Glycerol (syn. Glycerin, Glycerid) ist ein Alkohol, welcher aus drei Kohlenstoffen besteht. An jedem C befindet sich eine Hydroxylgruppe. Jede dieser Hydroxylgruppen kann mit einer FS verestert werden. Ist nur eine FS gebunden, handelt es sich um Monoacylglycerin, sind zwei FS gebunden, handelt es sich um ein Diacylglycerin (DAG), bei drei veresterten FS um ein Triacylglycerin (TAG). Die Hydroxylgruppe selbst ist hydrophil, die FS lipophil, somit steigt die Fettlöslichkeit eines Glycerolipids mit der Anzahl der FS [158].

2.7.7 Biochemische Verfahren zur Analyse von Lipiden

Bisher wurde das MS des Menschen sowie einiger Haus- und Versuchstiere mittels verschiedenster biochemischer Verfahren untersucht [19]. Unter anderem fanden Verwendung die Dünnschichtchromatographie (TLC) [14, 21] und die Massenspektrometrie mit verschiedenen Ionisationsverfahren (Atmosphärendruck-Ionisation (API MS), Elektrospray-Ionisation (ESI MS) [18] und der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI MS)) in Verbindung mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) [16, 74]. Aber auch die Gaschromatographie (GC) und die GC-Massenspektrometrie (GC-MS) [17] wurden für die Analyse genutzt.

Der Nachteil der TLC liegt darin, dass es starke Variationen in der Messstärke und Spezifität gibt. Daraus resultiert eine mögliche Fehlidentifikation der Lipide. Die GC hat neben den Vorteilen der hohen Sensitivität und guten Reproduzierbarkeit viele Nachteile. Die Proben müssen vor der Analyse hydrolysiert werden, was eine Aufspaltung der Esterverbindungen

von komplexen Lipiden nicht ausschließen lässt. Zudem können aus der langen Bearbeitungszeit des Materials bei hohen Temperaturen Veränderungen innerhalb der Moleküle entstehen. Die wohl wichtigste analytische Grenze der GC liegt aber darin, dass hochmolekulare Lipide ($> C_{30}$) nicht mit Sicherheit erkannt werden. Butovich et al. sehen die HPLC in Verbindung mit der API MS als am geeignetsten an [84]. Die leistungsfähige HPLC kombiniert mit der Sensitivität und Selektivität der MS liefert Informationen über die molekulare Masse des Materials und lässt so verschiedene Komponenten einer hochkomplexen Mischung aufzeigen [16].

2.7.8 Biochemie der Lipide

Cholesterin, FS und PL haben eine Gemeinsamkeit: sie sind amphiphil. Sie besitzen einen hydrophilen Anteil (Hydroxylgruppe) und einen hydrophoben (C-Kette). In biologischen Systemen (z. B. Zellen) ermöglicht diese Fähigkeit den Lipiden, in Verbindung mit Wasser Mizellen oder Lipiddoppelschichten zu bilden. Die Formierung zu einer Doppelschicht wird präferiert. Dabei treten die hydrophoben Enden der Lipide in Wechselwirkung miteinander und es entsteht ein hydrophober Zwischenraum. Die Wassermoleküle werden durch die Interaktion der FS verdrängt. Van-der-Waals-Kräfte fördern den Zusammenhalt zwischen den Molekülen der Fette. Zwischen den polaren und apolaren Anteilen der Lipide baut sich eine elektrostatische Bindung auf. Die Bildung der Doppelschichten unterliegt dem self assembly, also der spontanen und schnellen Selbstaggregation. Lipiddoppelschichten in biologischen Systemen haben drei wichtige Eigenschaften: 1. die Neigung sich auszubreiten, 2. Zusammenschluss mit sich selbst und 3. die Fähigkeit sich selbst zu reparieren [158]. Die Eigenschaften einer Lipiddoppelschicht, wie sie z. B. in Zellmembranen vorkommt, kann auf die LS des TF übertragen werden [17].

2.7.9 Wissensstand zur Biochemie der Lipidschicht des Tränenfilms

Die LS des TF hat nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen ähnlich dem Aufbau einer Zellmembran einen zweischichtigen Charakter [17], eine Schicht mit polaren Lipiden und eine mit nicht polaren. Die polare, eine dünne, der wässrigen Phase zugewandte Schicht stellt eine Verbindung mit der darunter liegenden wässrigen Phase her. Sie ist hydrophil. Die nicht

polare, hydrophobe Schicht sorgt für die Kohäsion und ist somit für die Stabilität des TF zuständig. Desweiteren verhindert sie die vorzeitige Evaporation der wässrigen Phase [7, 64, 79]. Auch dient sie als Lipidreservoir für die polare Schicht. Es scheint, als sei nicht einzig der hydrophobe bzw. hydrophile Charakter der Lipide für ihre Anordnung in einer der beiden Schichten verantwortlich. Die zusätzliche Anwesenheit kurzkettiger, unverzweigter, vor allem ungesättigter FS soll den Aufbau der LS entscheidend beeinflussen [17].

Die Angaben über die biochemische Komposition des MS variieren sehr stark [18, 84, 87, 114, 154]. Dieses ist wahrscheinlich zum einen in der Wahl verschiedener Analysemethoden begründet, zum anderen in der Technik, mit der das Probematerial entnommen wurde. Und auch die hohe Zahl der Lipidmoleküle, die beim menschlichen Meibum auf über 30.000 geschätzt wird, erschwert die Identifikation [153]. Dennoch zeigen alle bisher verwendeten biochemischen Analyseverfahren ähnliche Lipide auf, ihr prozentualer Anteil hingegen scheint von Verfahren zu Verfahren und Spezies zu Spezies zum Teil sehr unterschiedlich [1, 159] (s. Tab.1).

McCulley und Shine identifizierten Lipide des menschlichen MS mittels verschiedener Chromatographieverfahren [114]. Sie fanden Wachsester, Cholesterolester, Triglyceride, freie FS, Cerebroside, PL und Sphingolipide (u.a. Ceramide), Glycerole sowie Hydrocarbone und mehrfach ungesättigte FS (v.a. Ölsäure). Die Wachsester stellten mit 68% den größten Anteil dar, und der Anteil der Ölsäure an den von ihnen gemessenen FS betrug 20%. Die Phospho- und Sphingolipide besitzen zum größten Teil kurzkettige, gesättigte FS mit C₁₂-C₁₈. Bei den polaren Lipiden handelte es sich um Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, u.a. Die Triglyceride setzten sich zu 45% aus Ölsäure und zu 55% aus anderen kurzkettigen, ungesättigten FS zusammen. Desweiteren wiesen die Autoren darauf hin, dass es beim Menschen zwei Formen des Meibums zu geben scheint und dass beide physiologisch sind, MS mit Cholesterolestern und ohne. Abhängig von der An- bzw. Abwesenheit der Cholesterolester, setzen sich die übrigen, oben genannten Lipide in anderem Verhältnis zusammen [17]. Butovich et al. fanden bei der Analyse von humanem MS mittels HPLC-MS ebenfalls Wachs- und Cholesterolester sowie PL, aber keine Ceramide, keine Di- und Triacylglyceride, dafür aber freies Cholesterol [16].

Tab. 1: Zusammenfassung bisheriger Forschungen an der Lipidschicht des Tränenfilms bei versch. Spezies

Autor	Methode	Nachweisverfahren	Spezies	Ergebnisse
Linton et al. (1961) [90]	Meibum, manuelle Expression, Sammeln mit Glasstab	Flüssigkeitschromatographie	Mensch, gesund	neutrale Fette (bis 50%), Phospholipide (bis 10%)
Baron, Blough (1976) [14]	Meibum, Quetschen der Lider nach Schlachtung	TLC (für nicht polare Lipide), GLC (für Fettsäure, Ester, Alkohole)	Rind, gesund	95 % des Meibums: Wachsester, Cholesterolester, TAGs, 5% des Meibums: freies Cholesterol, freie FS
Tiffany (1978) [21]	Meibum, Quetschen der Lider, Sammeln mit Chalazion Küvette	TLC (für Lipidklassen), GLC	Mensch, gesund	Hydrocarbone, Squalene, Wachsester, Cholesterolester, TAGs, DAGs, Monoglyceride, freie FS, freies Cholesterol, Phospholipide
Tiffany (1979) [156]	nicht bekannt	nicht bekannt	Kaninchen, gesund	Sterolester, Wachsester, Monoglyceride, Diglyceride, freie FS, freie Sterole, freie Alkohole, polare Lipide, Hydrocarbone, TAGs
Nicolaides et al. (1981)	nicht bekannt	nicht bekannt	Mensch, gesund	Wachsester, Sterolester, polare Lipide, Diester, Hydrocarbone, Triglyceride, freie FS, freie Sterole
Nicolaides et al. (1981) [19]	nicht bekannt	nicht bekannt	Rind, gesund	Wachsester, Sterolester, polare Lipide, Diester, Hydrocarbone, Triglyceride, freie FS, freie Sterole
Wollensak et al. (1990) [74]	Tränenflüssigkeit, Mikrokapillare	HPTLC (High-performance thin-layer chromatography)	Mensch, gesund	Cholesterol- und Wachsester (45%), Phospholipide (15%), Cholesterol (15%), FS, TAGs
McCulley, Shine (1997) [17]	nicht bekannt	Dünnschichtchromatographie, GC, GC-MS, HPLC (UV)	Mensch, gesund	Wachsester (68%), Cholesterolester (16%), TAG (6%), Phospholipide (4%), Cerebroside (1,5%), Freie FS (1%), Hydrocarbone (bis 1%)
Ham et al. (2006)	Tränenflüssigkeit, microcapillary pipettes	MALDI-TOF MS (Analyse nur von polaren Lipiden)	Kaninchen, gesund	Phospholipide, Sphingolipide (m/z 494, 577, 637, 659, 678)
Ham et al. (2006) [88]	Tränenflüssigkeit, microcapillary pipettes	MALDI-TOF MS (Analyse nur von polaren Lipiden)	Kaninchen, dry eye	Phospholipide, Sphingolipide (m/z 494, 577, 605, 621, 637, 659, 678, 828)
Nichols, Ham et al. (2007) [18]	Meibum, manuelle Expression, Glaskapillare	ESI-Q-TOF II	Mensch, gesund	Oleamid, TAGs, freie FS, DAGs, Cholesterolester, Wachsester, freies Cholesterol, Hydrocarbone, polare Lipide(Phospho- und Sphingolipide)
Butovich et al. (2007) [159]	Meibum, Plastic-conformer, Spatula	HPLC	Mensch, gesund	v.a. Wachsester, Ölsäure (als Haupt-FS), Cholesterolester, freies Cholesterol, keine Phospholipide
Shine, McCulley (2009)	Meibum, Quetschen der Lider mit Conformer und Q-Tip, Platinum Spatula	TLC (für Lipidklassen), HPLC (UV) für polare Lipide	Mensch, gesund	Phosphatidylethanolamin 16,7 %, Sphingomyelin 14,0 %, Phosphatidylcholin 21,6 %, Cerebroside 23,5 %, P1 9,3 %, P2 3,2 %, P3 2,0%, U1 6,6%, U2 1,7 %, U3 1,2 %
Shine, McCulley (2009)	Meibum, Quetschen der Lider mit Conformer und Q-Tip, Platinum Spatula	TLC (für Lipidklassen), HPLC (UV) für polare Lipide	Mensch, chronische Blepharitis und KCS Symptomatik	Phosphatidylethanolamin 4,6%, Sphingomyelin 7,2%, Phosphatidylcholin 33,7 %, Cerebroside 26,2 %, P1 7,7 %, P2 2,8 %, P3 2,7%, U1 6,2 %, U2 6,9%, U3 2, %

Die polare LS besteht vor allem aus Phospho- und Sphingolipiden sowie kurzkettigen, unverzweigten und gesättigten FS [6]. Ein Großteil der polaren Lipide ist hydroxyliert. Die kurzkettigen FS sorgen für eine strukturelle Stabilität innerhalb der polaren Phase. Bestimmte Lipide (Phospho- und Sphingolipide) trennen in Anwesenheit von Wassermolekülen hydrophobe und hydrophile Lipide. PL besitzen eine Art Brückenfunktion und verbinden die wässrige Phase des TF mit der nicht polaren Schicht des Lipidfilms [17, 88]. Die strukturelle Stabilität der polaren Phase hängt stark von der Zusammensetzung der polaren Lipide ab. Aber auch enthaltene Ionen (Calcium, Kalium, Natrium, Chlorid und Bikarbonat) sowie der pH-Wert beeinflussen den Zusammenhalt der polaren Fette. Ein Ungleichgewicht in der Ionenverteilung oder im pH kann eine Instabilität der polaren Phase mit sich ziehen [17].

Es muss angeführt werden, dass im Besonderen die Menge an Phospho- und Sphingolipiden nicht bei allen Analyseverfahren gleich hoch war. Es wird zum Teil angenommen, dass stark polarisierte PL und Ceramide sowie Amide einiger FS nicht in den MD produziert werden [87, 153]. Stattdessen sollen andere, noch nicht völlig geklärte Mechanismen für die Sekretion dieser Lipide verantwortlich sein. Neue Untersuchungen ergaben zudem, dass die Menge an PL ganz im Gegenteil sogar sehr gering ist [84]. Dieses bestärkt die Vermutung einiger Autoren, dass stark polarisierte PL an einem anderen Ort gebildet werden müssen, auch wenn die Tatsache, dass MD holokrine Drüsen sind, dafür spricht, dass PL sezerniert werden müssen, schließlich sind sie am Aufbau von Zellmembranen beteiligt [159]. Um der Frage nach der Anwesenheit und der Herkunft der PL im TF nachzugehen, wurde bereits das MS verschiedener Spezies (Mensch, Rind, Katze und Kaninchen) und gleichzeitig die komplette Tränenflüssigkeit auf PL hin untersucht [88]. Während im MS des Kaninchens deutliche Mengen von PL gefunden wurden [160], war die Menge der PL bei Mensch, Rind und Katze marginal. In der Tränenflüssigkeit des Menschen hingegen wurden deutliche Spuren von PL nachgewiesen [84]. Die Untersuchungen bezüglich der PL bei Kaninchen könnten die These bestätigen, dass diese durch ihre polaren Eigenschaften den TF stabilisieren. Kaninchen blinzeln deutlich seltener als der Mensch [160].

In der nicht polaren Schicht sind vor allem die Wachs- und Cholesterolester, Triacylglyceride wie Tripalmitin, Alkohole der Palmitinsäure und der Myristinsäure, Behenöl, Oleamide, Mono- und Diacylglycerole sowie eine geringe Menge freien Cholesterins (0,5 %) enthalten [159]. Die von McCulley und Shine identifizierten nicht polaren Hydrocarbone sorgen für die

Kohäsion und senken die Verdunstungsrate der wässrigen Phase samt des darin enthaltenen Kohlendioxids, Sauerstoffs und der Ionen [17]. Hydrocarbone befinden sich in der nicht polaren Phase in der trans-Konfiguration. Die C-Ketten sind ausgestreckt und die Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Molekülen können maximal wirken, während die Entfernung der Moleküle zueinander minimal ist. Diese starke Interaktion zwischen den Lipiden erschwert es den Wassermolekülen zu verdunsten [153]. Die Wachsester und Triacylglycerine scheinen eine Verbindungsfunktion zwischen der polaren und apolaren Schicht zu erfüllen [17, 114]. Unpolare Lipide unterliegen stark thermodynamischen Einflüssen, wenn sie auf der wässrigen Phase verteilt werden, sie kollabieren und bilden Lipidvesikel, was zu einer ungeschützten wässrigen Phase und somit zur vorzeitigen Verdunstung führt [20]. Durch ihre hydrophilen Eigenschaften ist die polare Phase der LS aber imstande, die nicht polaren Lipide zu stabilisieren [20].

Tiffany et al. haben 1987 die Zusammensetzung der Lipide des TF bei verschiedenen Spezies analysiert (Mensch, Hamster, Ratte, Kaninchen, Rind) und starke Ähnlichkeiten festgestellt [161]. Wie schon bei McCulley und Shine bestanden 60-70 % des untersuchten Materials aus Wachsmoonestern und Sterolestern, wobei es sich nicht immer um Cholesterin gehandelt habe. Es waren zu 33% Dihydrolansterol, zu 26% Cholesterol und zu 18% Cholestanol [1].

Neuere biochemische Untersuchungen der LS mittels ESI-MS ergaben, dass das Ölsäureamid Oleamid einen Hauptbestandteil des humanen MS darstellt. Daneben wurden, jedoch in geringer Menge, Amide der gesättigte FS Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure sowie Amide der ungesättigten Fettsäure Linolen- und Erucasäure identifiziert [18]. Ebenfalls wurden in geringerer Menge Öl-, Myristin-, Palmin- und Stearinsäure nachgewiesen. Das an Menge herausragende Oleamid ist als Signaltransmitter aus der Neurologie bekannt. Es beeinflusst viele neurologische Prozesse im Körper, wie die Schlafphase, die Schmerzübertragung und die lokomotorische Aktivität. Desweiteren dient Oleamid als Transmitter in der Zell-zu-Zell-Kommunikation und als Schmerzmodulator. Die Annahme, dass es auch bei der Wundheilung oder der Symptomatik bei Augenerkrankungen eine Rolle spielt, liegt nahe [18]. Andere Autoren wiederum widersprechen den Angaben, dass Oleamid ein Hauptbestandteil sei, sie geben eine marginale gefundene Menge an Oleamid an. Jedoch ist ihrer Meinung nach das Oleamid in zahlreiche Wachsester eingebaut, was zur Annahme führt, dass Wachsester tatsächlich der Hauptbestandteil der humanen MS sind [159].

Neben den Lipiden konnten im MS in geringer Zahl auch Proteine nachgewiesen werden [84]. Diese sollen die Stabilität der LS positiv beeinflussen [5]. Eines der essentiellen Proteine, das mit der oberflächlichsten Schicht des TF in Zusammenhang gebracht wird, ist das Lipocalin [162]. Ein Protein, welches im TF nachgewiesen wurde und in der Lage ist, Lipide 1:1 zu binden [163, 164]. Es hilft, die Oberfläche der Cornea lipidfrei zu halten, indem es Lipide im TF bindet und zur LS transportiert, wenn sich diese aus ihrem Verbund in der LS lösen und in den darunter liegenden Schichten „verloren gehen“ [165]. Eine besonders hohe Affinität hat das Lipocalin zu PL, weniger zu Cholesterol [164, 166]. Zudem erhöht es die Oberflächenspannung der wässrigen Phase [165].

Obwohl seit Jahrzehnten Untersuchungen an der LS, vornehmlich beim Menschen, durchgeführt werden, kann bis heute die Zusammensetzung der LS nicht eindeutig angegeben werden. Einer der Gründe dafür ist sicherlich die Verwendung unterschiedlicher Methoden [81].

3 Arbeitshypothese und Fragestellung

Zahlreiche Studien verdeutlichen den Zusammenhang zwischen der LS des TF und dem ernstzunehmenden Krankheitsbild des „trockenen Auges“ beim Menschen [4, 5, 7, 12, 17, 87, 107, 167]. Noch immer ist die LS Mittelpunkt zahlreicher Forschung [89, 168-171]. In der Veterinärphthalmologie wird die LS als ursächlicher Faktor von Augenerkrankungen beim Hund diskutiert [150, 172], es fehlen jedoch Studien zur Klinik und zur Biochemie des caninen Lipidfilms. Dieser Mangel an Informationen führte zu den Zielen dieser prospektiven, klinischen Studie:

1. In der Humanmedizin bewährte Diagnostika (Tearscope-plus® [115, 138-140] und Meibometer MB 550 [54, 173]) sollten zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der LS bezüglich ihrer Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit an einer größeren Hundepopulation hinterfragt und hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit klinischen Parametern überprüft, sowie
2. die biochemische Zusammensetzung des MS beim Hund erstmalig charakterisiert werden.

In einem weiteren Projekt wurde im Hinblick auf spätere Studien

3. überprüft, ob die canine LS durch diätetische Maßnahmen beeinflusst werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Pilotprojekt zur Reproduzierbarkeit

Zur Gewährleistung der Wiederholbarkeit der angewandten Untersuchungsmethoden (Interferometrie, STT I und Meibometrie) wurde eine vorangestellte Studie an 8 voluntaristisch zur Verfügung gestellten Probanden durchgeführt (s. Anhang Tab. 12.1). Im Hauptprojekt konnten Messungen nur einmalig durchgeführt und daher ihre Reproduzierbarkeit nicht erneut bestätigt werden. Die Untersuchungen fanden im zweitägigen Abstand an drei Tagen sowie dreimal am letzten Untersuchungstag im Abstand von drei Stunden statt. Die Anordnung des Versuches sollte eine Reproduzierbarkeit an verschiedenen Tagen (im Wochenverlauf), aber auch an demselben Tag (im Tagesverlauf) überprüfen. Vom STT I ist bekannt, dass bei Mensch und Hund tageszeitliche Schwankungen auftreten [174] und auch die Produktion des MS soll tagesabhängigen Schwankungen unterliegen [104]. Vor jeder Messung erfolgte eine Allgemeinuntersuchung und eine ophthalmologische Untersuchung, gefolgt von STT I, Interferometrie und Meibometrie. Zwischen den einzelnen Untersuchungsschritten wurde ein zeitlicher Abstand von mind. 10 Minuten eingehalten, um die wechselseitige Beeinflussung auszuschließen. Neben der allgemeinen Gesundheit und der Augengesundheit war das Alter (ein bis zehn Jahre) Einschlusskriterium dieser prospektiven Studie.

4.1.2 Hauptprojekt zur Anwendbarkeit der Interferometrie und Meibometrie

Das Patientengut des Hauptprojekts bestand aus einer hinsichtlich des Alters, Geschlechts und Rassezugehörigkeit heterogenen, jedoch in der ophthalmologischen Praxis repräsentativen Gruppe von 98 Tieren. Es wurden Tiere mit einem Mindestalter von einem Jahr und einem Höchstalter von 10 Jahren in die Studie einbezogen, da bei jüngeren bzw. älteren Tieren analog zu Studien am Menschen davon ausgegangen werden muss, dass der TF und insbesondere die LS physiologischen, wachstums- bzw. alterungsbedingten Veränderungen unterworfen sind [9, 175, 176] und somit nicht repräsentativ wären. Trotz des Wissens über die höhere Neigung kastrierter Hündinnen am so genannten „trockenen Auge“ zu erkranken [177], wurden auch weibliche und männliche Kastraten untersucht, sofern sie ebenso wie die

nicht kastrierten Probanden keinerlei Anzeichen einer Augenerkrankung aufwiesen. Die Wahl der Probanden erfolgte willkürlich und die untersuchten Rassen stellen die große Vielfalt in der Region Berlin lebender Hunde dar, weshalb auch einige Mischlinge in die Studie aufgenommen wurden. Einige Rassen waren mehrmals vertreten. Diese waren drei Beagle, acht Boxer, vier Deutsche Schäferhunde, zwei Französische Bulldoggen, vier Golden Retriever, zwei Irish Setter, drei Jack Russel Terrier, zwei Königspudel, fünf Labrador Retriever, vier Mops, zwei Rhodesian Ridgebacks, zwei Riesenschnauzer, zwei Shi Tzu, zwei Weimaraner, zwei Westhighland White Terrier und drei Yorkshire Terrier (s. Anhang Tab. 12.2). Auch in dieser prospektiven, klinischen Studie waren Augen- und allgemeine Gesundheit sowie das Alter Einschlusskriterien.

4.1.3 Untersuchung der Blutfettwerte und des Schilddrüsenhormons T4

Veterinär- und humanmedizinische Studien belegen, dass der TF und insbesondere die LS durch veränderte Blutfettwerte oder durch endokrine Erkrankungen (z.B. Hypothyreose) verändert werden kann [61, 113] (s. Kapitel 2.5). Bei 59 Probanden wurden daher zusätzlich die Blutfette Cholesterin und Triglycerid und das Schilddrüsenhormon T4 bestimmt, um einen Einfluss auf die Interferenzbilder zu überprüfen.

4.1.4 Biochemische Analyse des caninen Meibom Sekrets

Neben den klinischen Studien zur Evaluierung von diagnostischen Verfahren zur Beurteilung der LS, wurde von 10 Hunden MS entnommen und biochemisch mittels HPLC-MSⁿ analysiert. Einschlusskriterien für diese Studie waren ebenfalls eine allgemeine und ophthalmologische Gesundheit der Tiere und ein Alter zwischen ein und zehn Jahren. Es handelte sich um sechs weibliche, zwei weiblich kastrierte und zwei männliche Tiere verschiedener Rassezugehörigkeit (Huskey, Do Khyi, Riesenschnauzer, Pudel, Schnauzer-, Pudel-, Dackel-, Terrier- und zwei Schäferhundmischlinge). Die Wahl der Probanden erfolgte zufällig und die Variabilität der Rassen entsprach dem Klientel der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin (Tabellarische Auflistung der Probanden s. Tab.12.3. im Anhang).

4.1.5 Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren – eine Fütterungsstudie

Im Anschluss an die Überprüfung der Reproduzierbarkeit (Kap. 4.1.1.) erhielten die gleichen acht erneut voluntaristisch zur Verfügung gestellten Hunde (s. Anhang Tab. 12.1.) über einen Zeitraum von 28 Tagen eine Supplementierung mit einem zugelassenen Ergänzungsfuttermittel (Viacutan® Plus, Fa. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Deutschland), welches hauptsächlich Omega-3- (Gamma-Linolensäure, Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure) und Omega-6- (Cis-Linolsäure) FS beinhaltet. Aus der Humanmedizin ist nachgewiesen, dass eine Supplementierung mit essentiellen FS die Tränenfilmstabilität erhöht und die Therapie des „trockenen Auges“ effektiv unterstützt [168, 178-182]. Die Dosierung pro Hund wurde entsprechend der Herstellerempfehlung angepasst und entsprach je nach Gewicht des Probanden einer bis drei Kapseln einmal täglich per os [183]. Dabei enthält eine Kapsel Viacutan® 190,0 mg Cis-Linolsäure, 105,0 mg Gamma-Linolensäure, 9,9 mg Eicosapentaensäure und 6,6 mg Docosahexaensäure. Am Tag 28 der Supplementierungsstudie erfolgte erneut eine vollständige Allgemein- und Augenuntersuchung, eine Messung der Tränenproduktion mittels STT I, die Beurteilung der LS und der Lipidproduktion mittels Interferometrie und Meibometrie. Die Tierhalter wurden durch ein Informationsblatt über den Verlauf und Zielsetzung der Studie unterrichtet.

4.2 Methodik

Die Arbeit stellt eine prospektive klinische Studie dar. Die Stichprobengröße von 98 Tieren (196 Augen) im Hauptprojekt entspricht einer Größe, die einen umfangreichen Überblick und eine qualifizierte Aussage zu den gewonnenen Ergebnissen der Lipidanalyse und der Anwendbarkeit des Tearscope®- plus zulässt und sich aus der Verfügbarkeit von Patienten ergibt. Samt der Studie zur Reproduzierbarkeit wurden insgesamt 106 Hunde (212 Augen) untersucht. Die Reihenfolge und die Durchführung der einzelnen Untersuchungsschritte richtete sich nach den Empfehlungen des Dry Eye Workshops aus der Humanmedizin [2] bzw. ist angelehnt an wissenschaftliche Publikationen aus der Veterinär- und Humanmedizin [54, 72, 138, 150]. Die Einschlusskriterien waren sowohl eine allgemeine Gesundheit als auch die Augengesundheit der Hunde, sowie das Alter, welches zwischen einem und zehn Jahren lag. Lokale Gaben ophthalmologischer Medikamente waren ein Ausschlusskriterium. Einer

das Allgemeinbefinden des Patienten beurteilenden Voruntersuchung folgten der Schirmer Tränen Test I, die Augenuntersuchung mittels Spaltlampenbiomikroskop, die Interferometrie, die Meibometrie und die Entnahme des MS. Die Details zu den einzelnen Methoden sind zum einen dem Kapitel 2.6. (Diagnostika zur Untersuchung des Tränenfilms) und den Kapiteln 4.2.3. bis 4.2.5. zu entnehmen. Um Verfälschungen der einzelnen Untersuchungsparameter zu verhindern, wurden die Patienten stets anhand eines invariablen Protokolls untersucht. Die gewonnenen Daten jedes Probanden wurden in einem Protokollbogen (s. Anhang Abb. 12.1 und Abb. 12.2) festgehalten.

4.2.1 Voruntersuchungen

Alle Probanden dieser Arbeit wurden voluntaristisch zur Verfügung gestellt oder waren Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, die zu einem Routineeingriff in Narkose in der Klinik vorgestellt wurden. Bei den Klinikpatienten wurde präoperativ eine obligatorische Allgemeinuntersuchung durchgeführt, bei den meisten Probanden zudem ein Röntgen des Thorax und eine Blutuntersuchung samt Differentialblutbild und Blutchemie (Leberwerte, Nierenwerte, Elektrolythaushalt), um die Narkosefähigkeit des Patienten sicherzustellen. Aufgrund der umfangreichen Voruntersuchungen konnte zum Zeitpunkt der klinischen Messungen und der Probenentnahme von gesunden Tieren ausgegangen werden.

4.2.2 Augenuntersuchung

Die Augenuntersuchung aller Hunde fand in einem abgedunkelten Raum mit konstanter Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit statt. Mit einem tragbaren Spaltlampenbiomikroskop Kowa SL-15 (Firma Kowa, Japan) wurden bei jedem Hund beide Augen systematisch beurteilt, wobei der Schwerpunkt der Untersuchung auf den für den TF relevanten vorderen Augenabschnitten lag. Dazu gehörte die Beurteilung der Symmetrie der Augen und der Lidstellung, die Beurteilung der Augenumgebung (auf Tränenfluss, Ausfluss, Schwellungen, etc.), der Augenlider samt Wimpern (auf eventuelle Umfangsvermehrungen, fehlwachsene Wimpern, sog. Distichiasis, etc.), der Ausführungsgänge der MD (auf

eventuelle Umfangsvermehrungen), der Konjunktiven, der Hornhaut und des sichtbaren Bereiches der Sklera (s. Anhang Abb. 12. 1).

4.2.3 Schirmer Tränen Test I

Um eine eventuelle Reflexproduktion der Tränen durch die Dauer anderer Untersuchungsschritte zu minimieren und das Ergebnis nicht durch die Manipulation am Auge während weiterer Untersuchungen zu verfälschen, wurde der Schirmer Tränen Test I (STT I, Firma Schering-Plough, Deutschland) stets zu Beginn durchgeführt. Zwecks der semiquantitativen Messung der wässrigen Anteile des TF wurden die genormten Teststreifen in beiden Augen am lateralen Kanthus im Unterlid eingesetzt, die Lider manuell sanft geschlossen gehalten und der Teststreifen nach einer Minute wieder entfernt. Das Ergebnis wurde, angegeben in mm/Minute, im Protokollformular festgehalten.

4.2.4 Interferometrie

Die Evaluierung der Morphologie der LS mittels Interferometrie erfolgte in einem abgedunkelten Raum mit dem nichtinvasiven Tearscope-plus® (Firma Keeler, Großbritannien). Das Gerät wurde als Handgerät mit einem Vergrößerungsvorsatz, dessen 10 Dioptrien starke Linse eine zwei bis dreifache Vergrößerung zulässt, benutzt, indem es direkt vor das zu untersuchende, offene Auge gehalten wurde (s. Abb. 6). Um eine objektive Beurteilung des TF zu gewährleisten, wurde zwischen der Interferometrie und den vorangegangenen Untersuchungsschritten (Spaltlampenbiomikroskopie und STT I) stets eine Zeitspanne von mindestens 10 Minuten eingehalten. Bei der Begutachtung des TF der gesamten Kornea beider Augen wurden die Interferenzbilder und –muster mehrere Sekunden lang beobachtet und im Protokollbogen als numerischer Wert (1 bis 6) dokumentiert. Die Einteilung der numerischen Werte war an die Einteilung der humanen LS im Handbuch zum Tearscope-plus® der Firma Keeler angelehnt [147]. Dabei entsprach bei Untersuchung des Hundeauges der Wert 1 einem grauen, groben Maschenwerk, der Wert 2 einem grauen feinen Maschenwerk, der Wert 3 einem grauen, wellenartigen, fließenden Muster, der Wert 4 einem grauen Bild ohne erkenntliche Muster (sog. homogenes Muster), der Wert 5 einem Muster mit diversen Interferenzfarben, der Wert 6 einem groben, körnigen Muster. An einem Auge

wurden gelegentlich auch mehrere Interferenzbilder gleichzeitig beobachtet. In diesem Fall wurde für das Auge ein neu geschaffener Wert protokolliert.

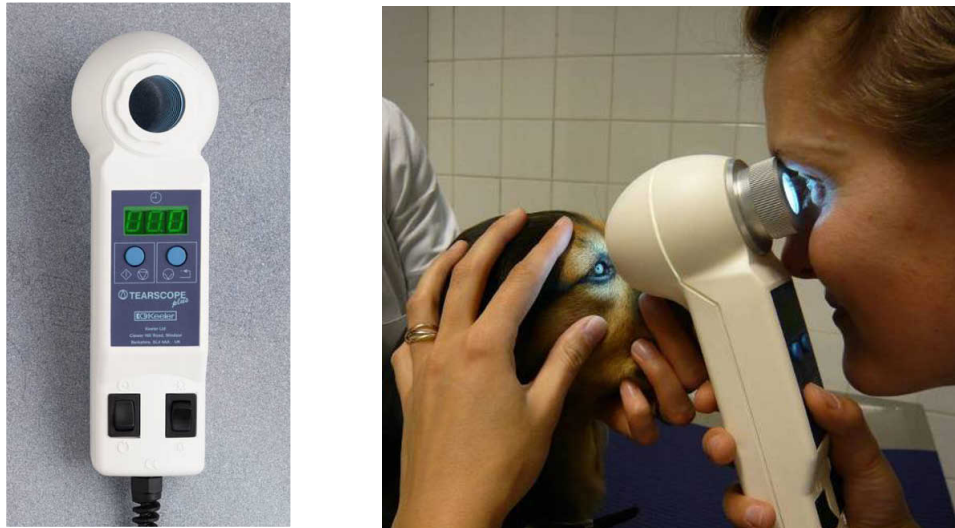


Abb. 6: Tearscope-plus® (links) und im Gebrauch am Hund mit Vergrößerungslinse (10 Dioptrien)

4.2.5 Meibometrie

Für die quantitative Evaluation des MS am Auge wurde für die bereits in der Veterinärmedizin etablierte Meibometrie das Meibometer MB 550 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany) eingesetzt [150-152]. Um ein verfälschtes Messergebnis zu vermeiden (z. B. aufgrund einer Resorption des MS durch den STT Streifen), wurde auch hier zwischen der Meibometrie und den vorangegangenen Untersuchungsschritten ein zeitlicher Abstand von mindestens 10 Minuten eingehalten. Die detaillierte Durchführung wurde bereits in Kapitel 2.6.5. erläutert und in dieser Studie bis auf wenige Modifikationen übernommen. So wurde die Folie exakt fünf Sekunden lang an das zu untersuchende, untere Augenlid gehalten (s. Abb. 7). Die Zeit, die die Verdunstung aller wässrigen Anteile an der Folie benötigt, wurde auf bis zu eine Stunde ausgedehnt. Zur Sicherstellung eines möglichst repräsentablen Messwertes bei der photometrischen Berechnung der Meibom Units wurde jede Folie fünfmal hintereinander photometrisch gemessen und daraus der Median ermittelt (s. Abb. 8 und Abb. 9).



Abb. 7: Entnahme des Meibom Sekrets am evertierten Unterlid mittels saugfähiger Plastikschleufe

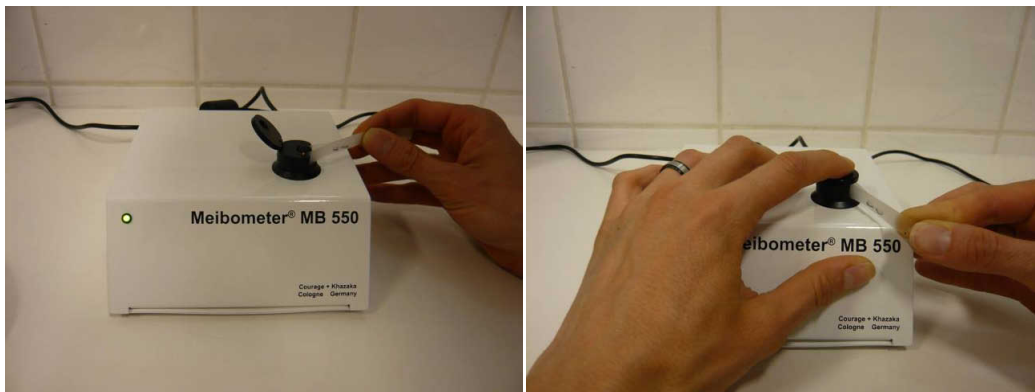


Abb. 8 Einsetzen des Messstreifens in die Messeinheit des Meibometers (linkes Bild) und das gleichmäßige Bewegen des Messstreifens in der photometrischen Einheit (rechtes Bild)

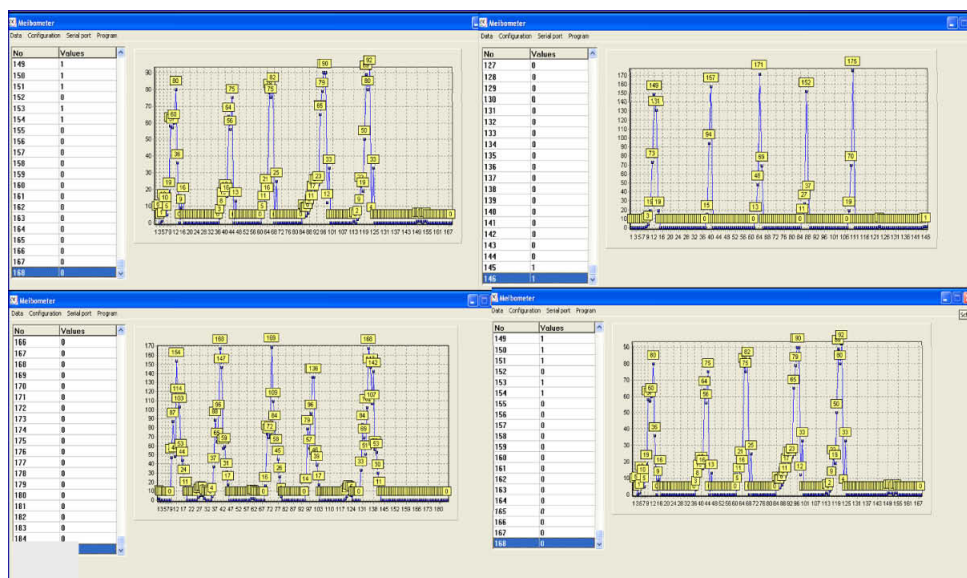


Abb. 9: Messergebnisse der Meibometrie- Messung, wie sie mittels EDV dargestellt werden

4.2.6 Probengewinnung

Für die biochemische Analyse des MS wurde als letzter Untersuchungsschritt von zehn zufällig gewählten Probanden eine kleine Menge MS entnommen. Da die Expression des Sekrets nach Informationen aus humanmedizinischen Studien als unangenehm empfunden werden kann [56, 169], erfolgte die Gewinnung erst, nachdem der Patient für seinen chirurgischen Eingriff eine Prämedikation erhielt und sich in tiefer Sedation befand. Die Prämedikation bestand aus einer intravenösen Kombinationsinjektion aus Levomethadon (L-Polamivet®, 0,2 bis 0,3 mg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KGW), intravenös), einem synthetischen Alkaloid vom Morphintyp, als Neuroleptanalgetikum [184], Midazolam (0,1 mg/kg/KGW, intravenös), einem Benzodiazepin, welches zur Sedation, Anxiolyse und Muskelrelaxation führt [184] und dem Hypnotikum Propofol (3mg/kg/KGW, intravenös), einem Alkylphenolderivat zur Vertiefung der Sedation und Einleitung der Narkose [184]. Sobald die Unempfindlichkeit des Patienten mittels Reflexüberprüfung sichergestellt war, wurde das MS in Anlehnung an humanmedizinische Studien entnommen und aufbewahrt [15, 74, 84]. Hierzu wurde an beiden Augen des Patienten das Unterlid von außen unter Beachtung der Hygienestandards mit zwei Fingern sanft komprimiert, bis ein klares Sekret aus den Öffnungen der MD austrat (s. Abb.10). Dieses wurde mit einem sterilen Edelstahlspatula aufgenommen und in ein HPLC Glasvial (Firma Roth, Deutschland) überführt, in dem sich ca. 1,5 ml eines Gemisches aus Ethanol/ Chloroform (Mischverhältnis 1:2) befand. Das Gefäß wurde mit einem Kunststoffdeckel, in das ein Teflonplättchen® eingelegt war, verschlossen und zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Das Teflonplättchen® dient dem Zweck, den Kontakt zwischen dem Lösungsmittel mit dem Kunststoff des Deckels zu verhindern, da in Untersuchungen von Butovich et al. angenommen wird, dass das aggressive Lösungsmittel Stoffe aus Kunststoff lösen kann, die bei der späteren Analyse der Lipide zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen können [74, 84]. Während des gesamten Prozesses wurde sichergestellt, dass das MS zu keinem Zeitpunkt mit Materialien aus Kunststoff in Kontakt kam. Das gelöste MS wurde bis zum Versand zur Analyse unter Wahrung entsprechender Sicherheitsbestimmungen bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

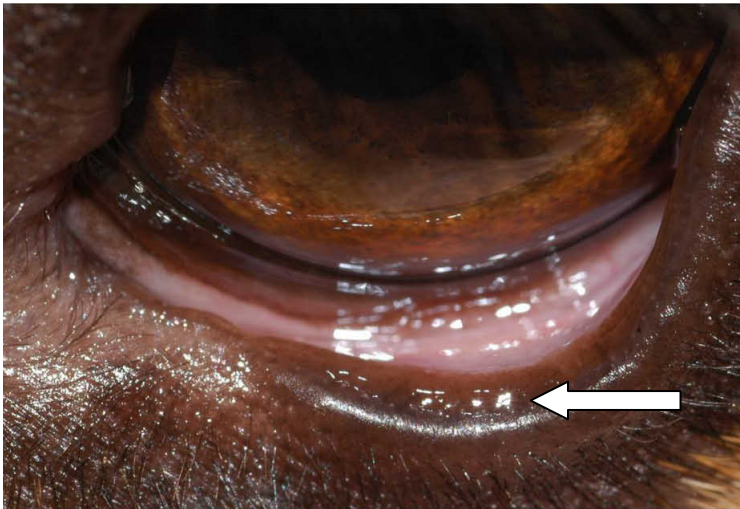


Abb. 10: Nach sanften Druck (soft squeeze) sammelt sich klares Meibom Sekret im Bereich der Drüsenausführungsgänge am Unterlid (s. Pfeil)

4.2.7 Probenaufarbeitung

Bis zum Versand wurde das MS im Ethanol/ Chloroform-Gemisch (Mischverhältnis 1:2) aufbewahrt. Just vor dem Versand an das analytische Labor wurden die Proben evaporiert. Hierzu wurde unter einem Abzug über Glaspipetten reiner Stickstoff in die Glasvials eingeleitet (s. Abb.11). Nach ca. 10 – 15 Minuten war die gesamte Flüssigkeit verdampft und reines MS blieb zurück. Die Vials wurden erneut mit einem Teflonplättchen® und Kunststoffdeckel verschlossen, sicher verpackt und verschickt.



Abb. 11: Evaporation des Lösungsmittels mit reinem Stickstoff unter einem Laminarflow

4.3 Biochemische Analyse

Zur Analyse des caninen MS wurde ein etabliertes Standardverfahren genutzt [15, 185]. Es handelt sich um die Flüssigkeitschromatographie zur Auftrennung von organischen Substanzen gekoppelt mit der Massenspektrometrie zur Charakterisierung der aufgetrennten Stoffe, die sog. HPLC-MSⁿ (*high pressure bzw. performance liquid chromatography – mass spectrometry*). Die biochemische Analyse mittels HPLC- MSⁿ fand in Kooperation mit und unter der Leitung von Dr. Igor A. Butovich und seinem Team an der Universität von Texas in Dallas statt (University of Texas Southwestern Medical Center, Department of Ophthalmology and the Graduate School of Biomedical Sciences, Dallas, TX, USA). Alle für die biochemische Analyse des caninen MS verwendeten Reagenzien entsprachen analytischem bzw. höherem Standard. Organische Lösungsmittel für die HPLC-MSⁿ Analyse und für die Spektroskopie wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) und Firma Burdick & Jackson (Muskegon, MI) und die Lipidstandards von der Firma Sigma-Aldrich und Nu-Chek Prep, Inc (Elysian, MN) hergestellt. Im Labor wurden die Proben mittels Mikrobalance gravimetrisch quantifiziert. Vor der Analyse wurde das Material in 1 ml Gemisch aus Hexan: Propanol 2 (1:1, v/v) verflüssigt. Die Analyse mittels HPLC-MSⁿ wurde analog zu den Studien von Butovich et al. durchgeführt und ihr detaillierter Ablauf ist den Veröffentlichungen zu entnehmen [8, 15, 16, 25, 84, 87, 108, 159, 186]. Zu erwähnen ist, dass bei der Untersuchung des caninen MS zum einen die *normal phase* (NP) und zum anderen die *reverse phase* (RP) HPLC verwandt wurde. Während die NP-HPLC die Trennung der einzelnen Lipide optimal durchführt, separiert die RP-HPLC die Lipide aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften [84]. Zum direkten Vergleich und zwecks Überprüfung der angewandten Methode wurde parallel die Analyse von drei Proben humanen MS durchgeführt [185].

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten (sowohl des Projekts zur Reproduzierbarkeit als auch des Hauptprojekts) erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12 und SPSS 18. Um signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen des STT I und der Meibometrie des rechten und des linken Auges eines Individuums aufzuzeigen, wurde der t-

Test für gepaarte Stichproben verwendet, für die Interferometrie der Wilcoxon Test. Die Reproduzierbarkeit des STT I, der Meibometrie und der Interferometrie wurde durch Wiederholungsmessungen untersucht und für den STT I und die Meibometrie durch eine multivariate Varianzanalyse und der Prüfung auf Innersubjekteffekte überprüft [187]. Um eine Relation zwischen den Ergebnissen des STT I, der Meibometrie und der Interferometrie aufzuzeigen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben genutzt, ebenso zur Überprüfung einer Abhängigkeit von STT I, Meibometrie, Alter und Blutwerten (Cholesterin, Triglyceride und T4) zwischen den sechs beobachteten Interferenzmustern (exemplarisch dargestellt im Anhang Tab. 12. 8 und Tab.12.9) Dabei galt stets der p-Wert bei $< 0,05$ als signifikant.

5 Ergebnisse

In die Studien wurden insgesamt 106 Hunde (212 Augen) einbezogen und ihre erhobenen Daten analysiert. Alle Untersuchungsmethoden wurden sehr gut geduldet und bei keinem der Probanden musste die Untersuchung vorzeitig abgebrochen werden.

5.1 Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit

Es wurden acht Hunde verschiedenen Alters (von 2 bis 10 Jahren) und Geschlechts (2 weiblich kastrierte, 2 männlich, 4 männlich kastrierte) untersucht. Die Untersuchungen fanden an den ersten beiden Tagen einmalig um 15:00 Uhr sowie am dritten und letzten Tag zu drei verschiedenen Uhrzeiten (09:00 Uhr, 12:00 Uhr, 15:00 Uhr) statt. Somit konnten die Untersuchungsmethoden sowohl von drei Tagen als auch von drei Zeitpunkten an ein und demselben Tag hinsichtlich der Reproduzierbarkeit überprüft werden. Bei den Probanden handelte es sich um einen Zwergpinscher (3 Jahre alt, männlich, kastriert), einen Boxer (4 Jahre alt, männlich), zwei Foxterrier (6 Jahre alt, männlich und 3 Jahre alt, männlich kastriert), einen Bodeguero (2 Jahre alt, weiblich, kastriert), einen English Setter (8 Jahre, weiblich, kastriert), einen Dackelmischling (10 Jahre, männlich, kastriert) sowie einen Schnauzer Mischling (6 Jahre, männlich, kastriert). Das Durchschnittsalter betrug $5,25 \pm 2,77$ Jahre.

5.1.1 Einzelergebnisse des Schirmer Tränen Tests I

Der STT I wurde bei acht Hunden (16 Augen) durchgeführt. Die Überprüfung mittels t-Test für gepaarte Stichproben zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen des rechten und linken Auges eines Tieres gab (p -Wert = 0,6). Aus diesem Grund konnten die erhobenen Daten im Folgenden wie nichtgepaarte Stichproben betrachtet werden, d.h. z. B. nur die Ergebnisse des rechten Auges eines Tieres konnten separat betrachtet werden (Test s. Anhang Tab. 12. 5.).

Die STT I-Werte aller untersuchten Augen zu den fünf Untersuchungszeitpunkten aufgeteilt nach Tagen (Wochenverlauf) und Uhrzeit (Tagesverlauf) sind in Tab. 2 dargestellt. Der gemessene STT I reichte von 15 bis 26 mm/Min, somit befanden sich alle Probanden stets im

Referenzbereich, der bei 15 bis 25 mm/Min liegt [128, 129]. Die zeitlichen Verläufe von Messungen an drei Tagen sowie von drei Messungen an einem Tag eines jeden Probanden sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt. Die tagesabhängige und tageszeitliche Wiederholbarkeit des STT I wurde mithilfe einer multivariaten Varianzanalyse sowie des Tests auf Innersubjekteffekte überprüft. Bei diesem statistischen Verfahren sind die Differenzen zwischen den einzelnen Messwerten entscheidend. Eine Differenz zwischen zwei oder mehr Messwerten von Null würde eine Reproduzierbarkeit der Methode belegen. Da jedoch bei keiner klinischen wiederholten Messung stets das gleiche Ergebnis vorzufinden ist (d.h. Differenz von $= 0$), werden bei der multivariaten Varianzanalyse tolerierbare Differenzen zwischen den Messungen analysiert. Zeigen diese im zeitlichen Verlauf keine Richtung (d.h. die Werte eines Probanden werden im Tagesverlauf/ Wochenverlauf systematisch kleiner oder größer), sondern ergeben ± 0 , kann die Reproduzierbarkeit dennoch angenommen werden (s. Anhang Tab. 12. 5).

Tab. 2: Darstellung der STT I Werte (angegeben in mm/Min) zu den verschiedenen Zeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge und der dazugehörigen Mittelwerte

Proband	1		2		3		4		5		6		7		8	
Messung an	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS
Tag 1 (15:00 Uhr)	22	21	24	25	17	17	18	16	21	21	18	19	23	22	22	25
Tag 2 (15:00 Uhr)	20	18	25	23	18	18	17	19	22	21	19	20	25	23	17	18
Tag 3 (15:00 Uhr)	20	18	24	25	17	18	16	20	20	23	20	18	23	22	18	21
Mittelwert	20.67	19.00	24.33	24.33	17.33	17.67	17.00	18.33	21.00	21.67	19.00	19.00	23.67	22.33	19.00	21.33
Tag 3 (9:00 Uhr)	20	17	26	25	19	15	17	20	20	23	18	17	24	22	23	22
Tag 3 (12:00 Uhr)	21	20	25	23	17	18	18	17	22	20	18	18	25	23	22	23
Tag 3 (15:00 Uhr)	20	18	24	25	17	18	16	20	20	23	20	18	23	22	18	21
Mittelwert	20.33	18.33	25.00	24.33	17.67	17.00	17.00	19.00	20.67	22.00	18.67	17.67	24.00	22.33	21.00	22.00

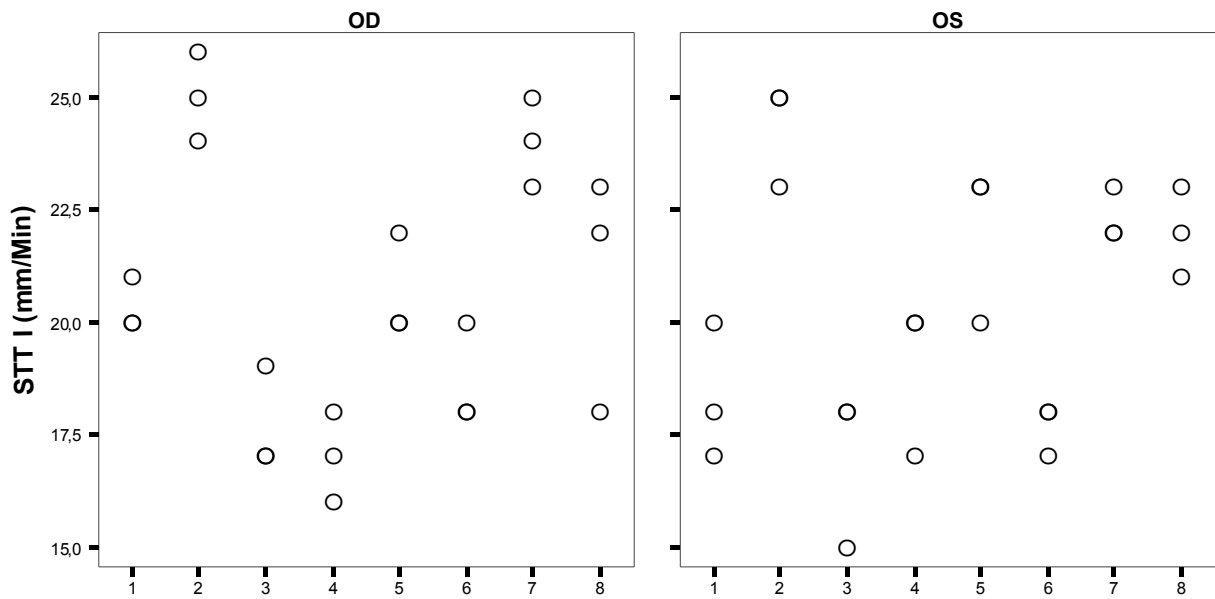


Abb. 12: Graphische Darstellung der STT I Werte (in mm/Min) von 3 Tagen zur gleichen Uhrzeit am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) der Probanden (X-Achse)

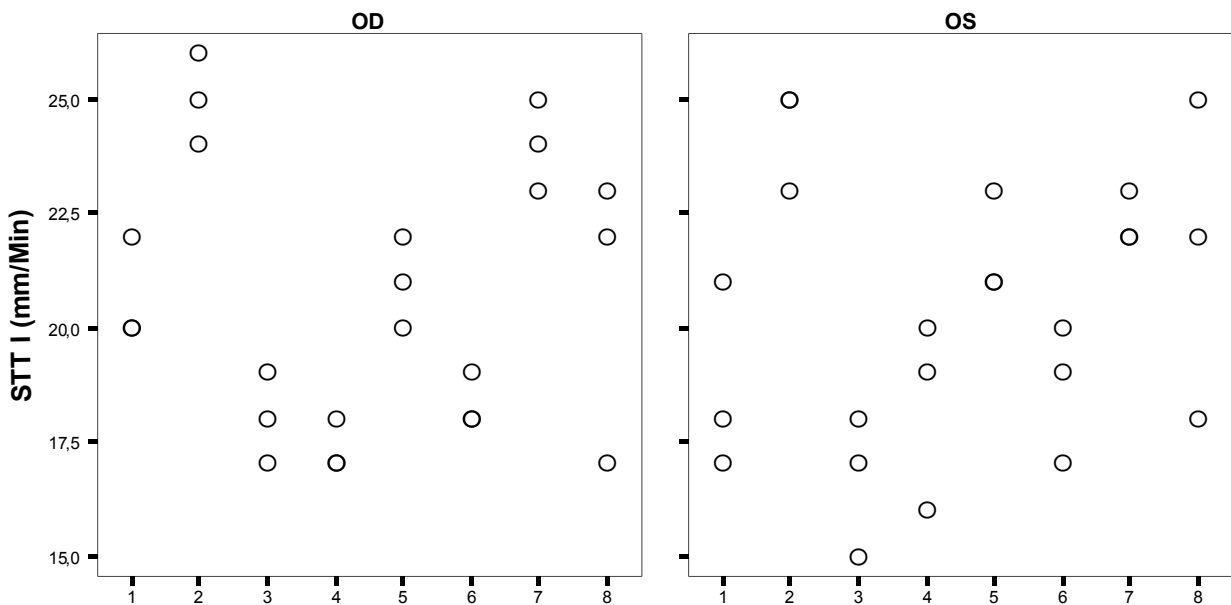


Abb. 13: Graphische Darstellung der STT I Werte (in mm/Min) aus drei Messungen an einem Tag (Tag 3) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) der Probanden (X-Achse)

5.1.2 Einzelergebnisse der Interferometrie

Bei acht Hunden (16 Augen) wurde die LS an drei verschiedenen Tagen und an einem Tag zu drei verschiedenen Tageszeiten mittels Interferometrie betrachtet. Es wurden 3 von 6 möglichen Mustern (analog zu Guillon [138]) beobachtet. Zudem zeigten einige Messungen Mischbilder, d.h. bei der Betrachtung des TF eines Individuums wurden eindeutig zwei Muster gleichzeitig gesehen. Die in dieser Studie beobachteten Muster sowie ihre Häufigkeit sind in Tab. 3 und Tab. 4 dargestellt. Mittels Wilcoxon Rangsummen Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den im rechten und linken Auge eines Tieres beobachteten Interferenzbildes festgestellt werden, somit konnten Ergebnisse der Messungen als ungepaarte Stichproben betrachtet werden (Test s. Anhang Tab. 12. 7).

Tab. 3: Darstellung der beobachteten Interferenzbilder zu den verschiedenen Betrachtungszeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge von acht Probanden. (3= Wellenmuster, 4 = homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 9= Wellenmuster/ Interferenzfarben)

Proband	1		2		3		4		5		6		7		8	
Messung an	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS
Tag 1 (15:00 Uhr)	4	4	3	3	3	3	9	9	3	5	5	3	3	3	3	3
Tag 2 (15:00 Uhr)	4	4	3	3	5	3	5	9	3	3	3	5	3	3	3	3
Tag 3 (15:00 Uhr)	3	4	3	3	5	5	5	5	9	5	3	5	3	3	3	3
Tag 3 (9:00 Uhr)	3	4	3	3	5	5	5	5	3	3	5	3	3	3	3	9
Tag 3 (12:00 Uhr)	4	4	3	3	3	3	9	5	3	3	5	5	3	3	3	3
Tag 3 (15:00 Uhr)	3	4	3	3	5	5	5	5	9	5	3	5	3	3	3	3

Tab. 4: Absolute, prozentuale und kumulierte Häufigkeit der beobachteten Interferenzmuster der 16 Augen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (n=80)

Interferenzbild	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Wellenmuster	47	58,8	58,8	58,8
homogenes Muster	8	10,0	10,0	68,8
Interferenzfarben	19	23,8	23,8	92,5
Wellenmuster/Interferenzfarben	6	7,5	7,5	100,0
Gesamt	80	100,0	100,0	

Angelehnt an die Einordnung der Interferenzbilder am Menschen [138, 147] wurden drei Muster beim Hund nicht beobachtet. Diese waren Muster 1 und 2 (feines und grobes Maschenwerk) sowie das Muster 6 (abnorme LS). Eine statistische Überprüfung der Reproduzierbarkeit ist bei der Interferometrie nicht durchführbar, da es sich bei den beobachteten Mustern um nominale Daten handelt. Lediglich eine Annahme über die Reproduzierbarkeit ist aufgrund einer deskriptiven Betrachtung der Ergebnisse zulässig. Betrachtet man die beobachteten Interferenzmuster in einem Auge eines Probanden, so konnten in sieben Augen sowohl an den unterschiedlichen Tagen als auch zu den drei Messungen an einem Tag immer das gleiche Interferenzmuster beobachtet werden. In neun Augen weichte lediglich ein Wert ab. Von diesen 9 Augen mit einem abweichenden Wert waren 3 Augen, bei denen das abweichende Interferenzbild ein Mischbild war, welches das Interferenzbild der 2 anderen Messungen beinhaltete (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Absolute und prozentuale Darstellung der beobachteten Interferenzmuster während der Reproduzierbarkeitsstudie aller untersuchten Augen (n=16)

untersuchte Augen (n= 16)	3 von 3 identisch*	2 von 3 identisch** (***)
Tag 1, 2, 3 (15:00 Uhr)	7	9 (3)
Tag 1 (9:00, 12:00, 15:00)	7	9 (3)

(* = es wurde dreimal das gleiche Interferenzbild beobachtet, **= von drei Beobachtungen weichte ein Interferenzbild ab, ***= das abweichende Interferenzbild war ein Mischbild, welches das Muster des anderen Interferenzbildes beinhaltet)

5.1.3 Einzelergebnisse der Meibometrie

Es wurde bei allen acht Hunden (16 Augen) die Meibometrie durchgeführt. Auch hier erlaubt der Beweis mittels t-Test für gepaarte Stichproben eine eigenständige Betrachtung der einzelnen Augen eines Tieres, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen den rechten und den linken Augen der Probanden gegeben hat (Test s. Anhang Tab. 12. 6). Die Ergebnisse der Meibometrie aller untersuchten Augen im Wochen- und Tagesverlauf sind in Tab. 6 dargestellt. Die Ergebnisse der Meibometrie schwanken von 88 bis 379 MU. Die Reproduzierbarkeit der Meibometrie würde mithilfe einer multivariaten Varianzanalyse (wie bei der Interferometrie, s.o.) kein aussagekräftiges Ergebnis liefern. Denn die Streuung der Messwerte bei jedem der acht Probanden sowohl im Wochenverlauf als auch im Tagesverlauf schließt die Reproduzierbarkeit bereits aus (s. Abb. 14 und Abb. 15). Wiederholt gleich gemessene Werte sind selbst unter Berücksichtigung einer gewissen Toleranz (z. B.: +/- 20 MU) zwischen den Einzelmessungen nicht zu erzielen.

Tab. 6: Darstellung der Meibometriewerte (angegeben in MU =Meibom Units) an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten am rechten (OD) und linken (OS) Auge und der dazugehöriger Mittelwerte von acht untersuchten Hunden

Proband	1		2		3		4		5		6		7		8	
Messung an	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS
Tag 1 (15:00 Uhr)	208	268	312	279	220	133	102	176	230	182	213	175	176	152	225	183
Tag 2 (15:00 Uhr)	145	272	234	379	214	218	190	124	214	152	261	145	275	270	123	159
Tag 3 (15:00 Uhr)	223	218	273	253	124	206	175	88	206	234	185	204	214	96	246	154
Mittelwert (Tag 1, 2, 3)	192.00	252.67	273.00	303.67	186.00	185.67	155.67	129.33	216.67	189.33	219.67	174.67	221.67	172.67	198.00	165.33
Tag 3 (9:00 Uhr)	119	201	218	346	325	150	133	145	339	232	220	267	221	244	169	209
Tag 3 (12:00 Uhr)	225	225	171	221	247	103	223	263	234	202	164	320	157	133	201	105
Tag 3 (15:00 Uhr)	223	218	273	253	124	206	175	88	206	234	185	204	214	96	246	154
Mittelwert Tag 3 (9:00, 12:00, 15:00)	189.00	214.67	220.67	273.33	232.00	153.00	177.00	165.33	259.67	222.67	189.67	263.67	197.33	157.67	205.33	156.00

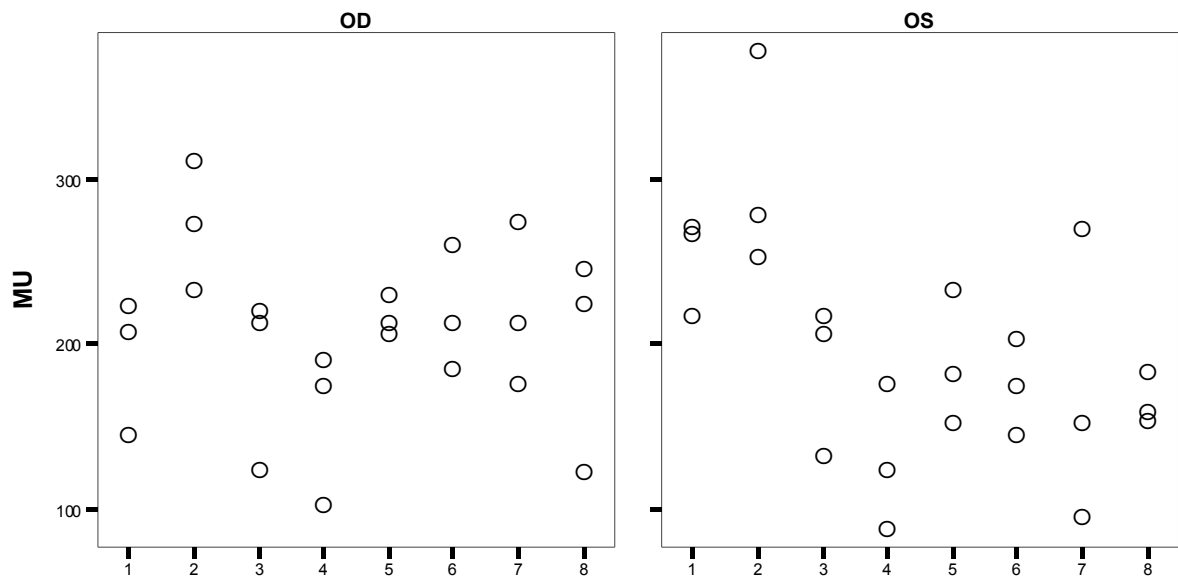


Abb. 14: Graphische Darstellung der Meibometriemessungen (angegeben in Meibom Units, MU) von 3 Tagen zur gleichen Uhrzeit gemessen (15:00 Uhr) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) von acht untersuchten Probanden (X-Achse)

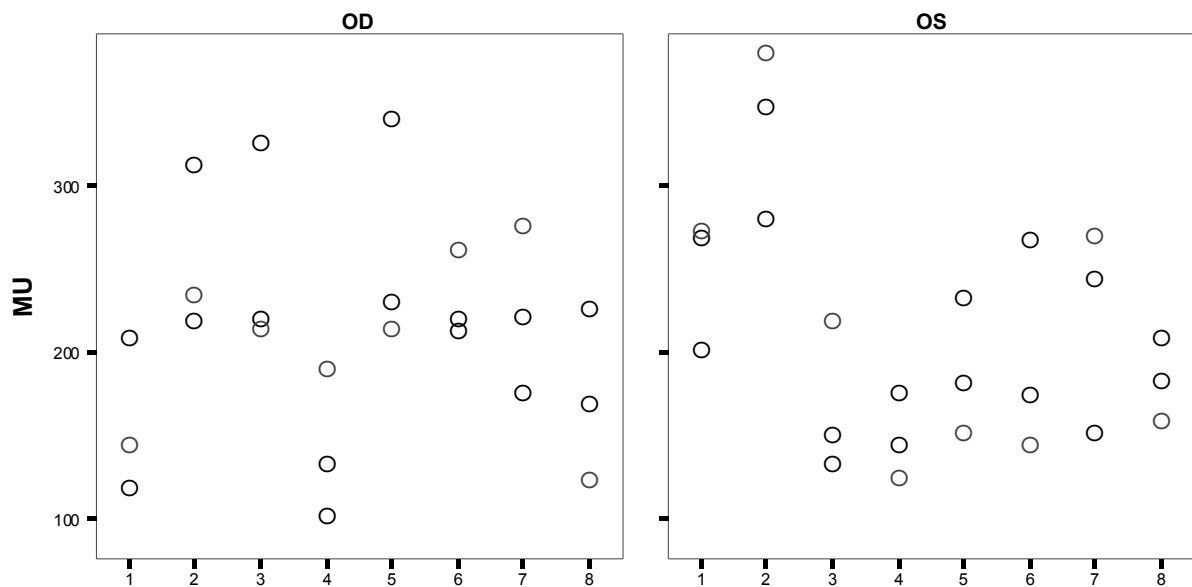


Abb. 15: Graphische Darstellung der gemittelten Meibometrie Messwerte (in Meibom Units, MU) aus drei Messungen an einem Tag (Tag 3) am rechten Auge (OD) und linken Auge (OS) ein jeden der acht Probanden (X-Achse)

5.1.4 STT I und Interferometrie

In der graphischen Darstellung der beobachteten Interferenzmuster in der Reproduzierbarkeitsstudie und der dazugehörigen STT I Werte lässt sich eine deutliche Tendenz erkennen. Mit zunehmender Lipidschichtdicke sinkt der STT I, was bedeutet, dass die Produktion der wässrigen Anteile sich antiproportional zur Dicke der LS verhält (s. Abb. 16).

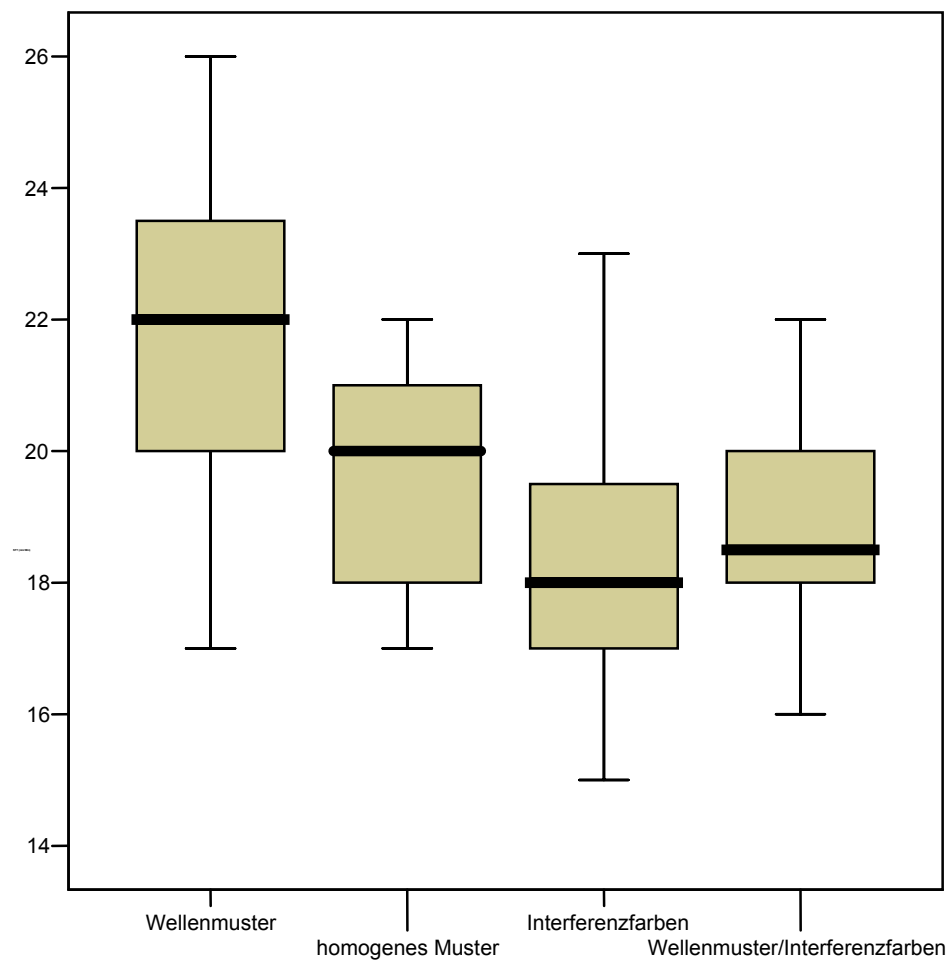


Abb. 16: Graphische Darstellung der beobachteten Interferenzmuster und der dazugehörigen STT I Werte (n=80, 10 Messungen je Tier) während der Wiederholbarkeitsstudie

5.2 Ergebnisse des Hauptprojekts

Es wurden 98 Hunde verschiedenen Alters, Geschlechts und Rassezugehörigkeit untersucht (Auflistung der einzelnen Probanden nach Rasse, Alter und Geschlecht s. Tab. 12. 2. im Anhang). Bei der Auswahl der Probanden wurde nicht gezielt eine gleichmäßige Verteilung bezüglich des Alters, des Geschlechts oder der Rassezugehörigkeit angestrebt, sondern die Probanden vielmehr zufällig ausgewählt. Dieses hatte eine gewisse Auswirkung auf die Normalverteilung, insbesondere die des Alters, zur Folge. Hinsichtlich des Alters waren alle Altersklassen, die das Einschlusskriterium erfüllten (zwischen ein und zehn Jahren) vertreten. Das Durchschnittsalter \pm SD der 98 Hunde betrug $4,72 \pm 2,95$ Jahre, wobei deutlich mehr junge Hunde (bis zum fünften Lebensjahr) untersucht wurden (s. Abb. 17). Die Geschlechter waren nahezu gleichverteilt, es wurden 48 Hündinnen (davon 18 kastrierte) und 50 Rüden (davon 18 kastrierte) untersucht (s. Tab. 7).

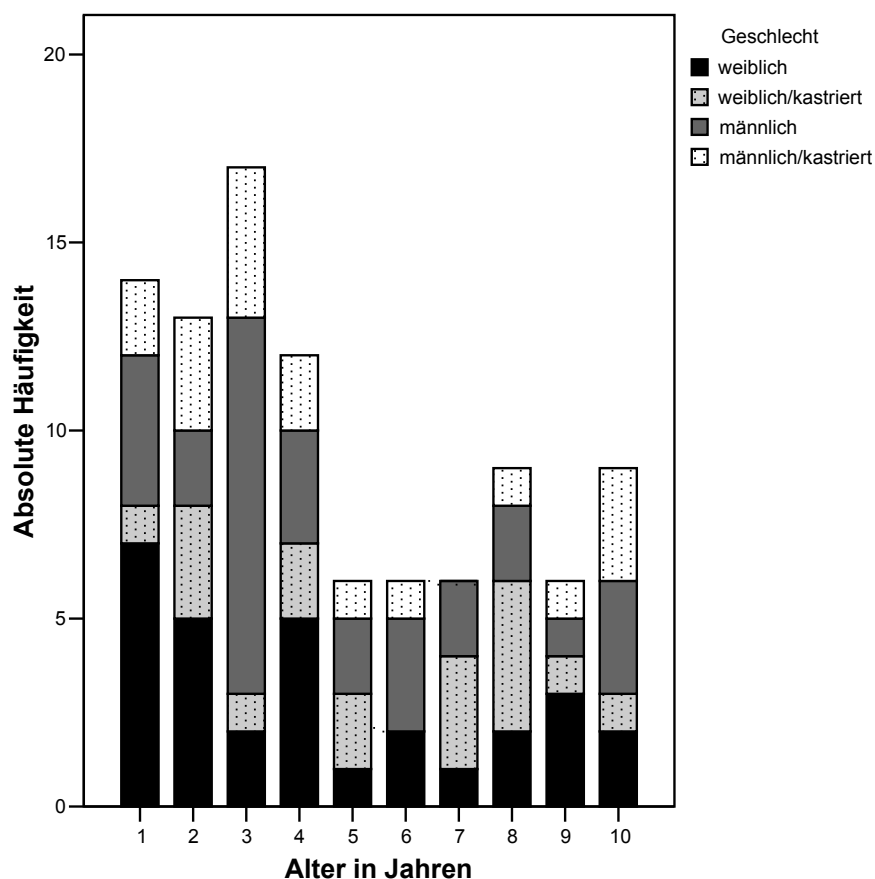


Abb. 17: Alters- und Geschlechtsverteilung aller untersuchten Hunde (n = 98)

Tab. 7: Absolute und prozentuale Geschlechterverteilung aller untersuchten Hunde (n=98)

Geschlecht	n _p = Probanden	Prozent
weiblich	30	30,6%
weiblich/kastriert	18	18,4%
männlich	32	32,7%
männlich/kastriert	18	18,4%
Gesamt	98	100,0%

Alle Probanden wurden einer Augenuntersuchung samt STT I und einer Beurteilung der LS mittels Interferometrie unterzogen und die Ergebnisse protokolliert. Nicht bei allen 98 Hunden wurden die Meibometrie sowie die Entnahme des MS und die Blutprobenentnahme (zwecks Triglycerid-, Cholesterol- und T4 –Bestimmung) durchgeführt. So entstanden, je nachdem welche Untersuchungsschritte vorgenommen wurden und welche Daten zur Verfügung standen, vier Untergruppen: Bei allen 98 Hunden wurde eine vollständige Augenuntersuchung samt STT I und die Interferometrie durchgeführt. Bei 56 Hunden wurde zusätzlich die Meibometrie durchgeführt und bei 59 Hunden wurden alle Blutwerte bestimmt und MS zur biochemischen Analyse entnommen. Eine Auflistung der Einzelergebnisse aller durchgeführten Untersuchungen befindet sich Anhang (s. Tab. 12.4).

Tab. 8: Unterteilung aller im Hauptprojekt untersuchten Hunde in vier Untergruppen abhängig von den durchgeführten Untersuchungen

Untergruppe	Augenuntersuchung	STT I	Interferometrie	Meibometrie	Blutwertbestimmung	Entnahme des MS	Anzahl	Prozent
1	x	x	x	x	x	x	n ₁ =48	49,0%
2	x	x	x		x	x	n ₂ = 11	11,2%
3	x	x	x				n ₃ =31	31,6%
4	x	x	x	x			n ₄ =8	8,2%
Σ	98	98	98	56	59	59	n _Σ =98	100%

5.2.1 Einzelergebnisse

5.2.1.1 Schirmer Tränen Test I

Der STT I wurde an 98 Hunden (196 Augen) durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen mussten zuerst als gepaarte Stichproben individuell betrachtet werden (statistisch mittels t-Test für gepaarte Stichproben). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem STT I des rechten und des linken Auges eines Individuums festgestellt, $p= 0,653$. Folglich konnten Messwerte des rechten und des linken Auges eines Probanden unabhängig betrachtet werden und im Anschluss mit anderen Parametern (Meibometrie, Interferometrie, Blutwerte) verglichen und analysiert werden. Der STT I aller 196 Augen reichte von 12 mm/min bis 35 mm/min und betrug im Mittelwert (\pm SD) $20,06 \pm 3,96$ mm/Min.

5.2.1.2 Interferometrie

An 98 Hunden (196 Augen) wurde die LS des präokulären TF mittels Interferometrie beurteilt. Die Beurteilung der Interferenzmuster erfolgte analog der Beurteilung der menschlichen LS nach Guillon (Werte 1- 6, s. Kapitel 2.6.4) [138, 188]. Jedoch war es nicht immer möglich, den beobachteten Interferenzen einen Wert eindeutig zuzuordnen, so dass das eindeutige Auftreten von 2 verschiedenen Mustern durch weitere, neu generierte Werte (Werte 7-9) protokolliert wurde (alle beobachteten Interferenzmuster beim Hund s. Abb. 18).



Bild 1



Bild 2



Bild 3



Bild 4



Bild 5



Bild 6

Abb. 18: Beobachtete Interferenzmuster und Farben: Bild 1: Wellenmuster (Muster 3), Bild 2: homogenes Interferenzbild (Muster 4), Bild 3: Interferenzfarben (Muster 5), Bild 4: Mischbild 7 (Wellenmuster/homogenes Muster) Bild 5: Mischbild 8 (homogenes Bild mit Interferenzfarben); Bild 6: Mischbild 9 (Wellenmuster/Interferenzfarben)

Tab. 9: Vorkommen unterschiedlicher Interferenzmuster an der Augenoberfläche bei gesunden 98 Hunden (196 Augen)

Wert	Interferenzbild	Häufigkeit n = Augen	Prozent
3	Wellenmuster	50	25,5%
4	Homogenes Muster	69	35,2%
5	Interferenzfarben	37	18,9%
7	Wellenmuster/ homogenes Muster	22	11,2%
8	Homogenes Muster/ Interferenzfarben	9	4,6%
9	Wellenmuster/Interferenzfarben	9	4,6%
gesamt		196	100,0

Bei 78 Hunden wurde in beiden Augen (rechtes und linkes Auge eines Individuums) das gleiche Interferenzbild beobachtet (OD=OS), während bei 20 Hunden in den beiden Augen unterschiedliche Muster beobachtet wurden (OD≠OS). Das Vorkommen der beobachteten Muster in 196 Augen ist in Tab. 9. dargestellt. Die Verteilung der in beiden Augen gleichen Muster ist in Tab. 10 angezeigt. Die Verteilung der bilateral ungleichen Muster ist in Tab. 11 dargestellt. Bei der Auswertung aller gepaarten Stichproben mittels Wilcoxon Test (n = 98) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Interferenzbildern des rechten und des linken Auges eines Individuums beobachtet werden (p= 0,522).

Tab. 10: Absolute und prozentuale Häufigkeiten bilateral gleicher Interferenzmuster bei n= 78 Hunden

Wert	Beobachtetes Interferenzbild	Häufigkeit	Prozent
3	Wellenmuster	19	24,4 %
4	Homogenes Muster	28	35,9 %
5	Interferenzfarben	15	19,2 %
7	Wellenmuster/ homogenes Muster	9	11,5 %
8	homogenes Muster/ Interferenzfarben	4	5,1 %
9	Wellenmuster/ Interferenzfarben	3	3,8 %
	Gesamt	78	100 %

Tab. 11: Absolute und prozentuale Häufigkeiten bilateral ungleicher Interferenzmuster bei n= 20 Hunden

	Häufigkeit	Prozent
Wellenmuster, homogenes Muster	5	25,0%
Wellenmuster, Interferenzmuster	4	20,0%
homogenes Muster, Wellenmuster/homogenes Muster	3	15,0%
homogenes Muster, Interferenzfarben	3	15,0%
homogenes Muster, homogenes Muster/Interferenzfarben	1	5,0%
Wellenmuster, homogenes/Wellenmuster	1	5,0%
homogenes Muster, Wellenmuster/ Interferenzfarben	1	5,0%
homogenes Muster, Wellenmuster/Interferenzfarben	2	10,0%
Gesamt	20	100,0

5.2.1.3 Meibometrie

Die semiquantitative Beurteilung der Lipidproduktion am Lidrand wurde an 56 (112 Augen) der 98 untersuchten Hunde mittels Meibometrie durchgeführt (s. Tab. 12). Die Betrachtung der gepaarten Messergebnisse im rechten und linken Auge eines jeden Probanden ergab keinen signifikanten Unterschied, $p= 0,169$. Darum kann nachfolgend hier die Betrachtung der Ergebnisse unabhängig erfolgen (es können alle rechten und alle linken Augen gemeinsam betrachtet werden). Die Meibometrie der 112 untersuchten Augen betrug im Schnitt $299,47 \pm 170,4$ Meibom Units (MU) (Min 35 MU, Max 1089 MU).

Tab. 12: Deskriptive Darstellung der Meibometriemessungen in MU bei n= 56 Hunden

Untersuchte Augen (n = OD + OS)	112
Mittelwert	299,47
Standardabweichung	170,40
Minimum	35,0
Maximum	1089,0

5.2.1.4 Betrachtung der Interferenzmuster und des STT I

Eine graphische Darstellung der sechs beobachteten Interferenzmuster und der dazugehörigen STT I Werte mittels Boxplot zeigte, dass bei bestimmten Interferenzmustern die Produktion der Tränenflüssigkeit niedriger bzw. höher war als bei anderen (s. Abb. 19). So betrug der mittlere STT I in den 50 Augen mit dem Interferenzmuster 3 (Wellenmuster) $21,10 \pm 3,94$ mm/Min, während er bei dem in 37 Augen beobachteten Interferenzmuster 5 (Interferenzfarben) bei $18,94 \pm 4,34$ mm/min lag (s. Tab. 13). Dennoch konnte mittels t-Test für unabhängige Stichproben kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Interferenzbildern hinsichtlich des STT I festgestellt werden (t-Tests s. Anhang Tab. 12. 8.). Ein p Wert $< 0,05$ galt hierbei als signifikant. Auch eine separate Betrachtung zur Überprüfung von Tieren mit homogenem, d.h. gleichem Interferenzmuster in beiden Augen, erbrachte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des STT I (Auflistung der einzelnen p-Werte s. Tab. 19). Somit liegt zumindest statistisch auch keine Korrelation zwischen dem STT I und den Interferenzmustern vor (s. Abb. 19 und Abb. 20).

Tab. 13: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung des STT I innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzmuster*	3	4	5	7	8	9
Untersuchte Augen n= 196	50	69	37	22	9	9
Mittelwert	21,10	19,68	18,59	21,73	20,67	18,56
Standardfehler des Mittelwerts	0,56	0,45	0,71	0,76	1,31	0,64
Median	20	19	18	21,5	20	18
Standardabweichung	3,94	3,76	4,34	3,58	3,94	3,78
Minimum	15	14	12	17	15	16
Maximum	35	30	30	30	28	22
Perzentil						
25	18	17	15	18	17,5	17
50	20	19	18	21,5	20	18
75	24	22	21	25	23	20

* 3= Wellenmuster, 4= homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 7= Wellenmuster/homogenes Muster, 8= homogenes Muster/ Interferenzfarben, 9= Wellenmuster/Interferenzfarben

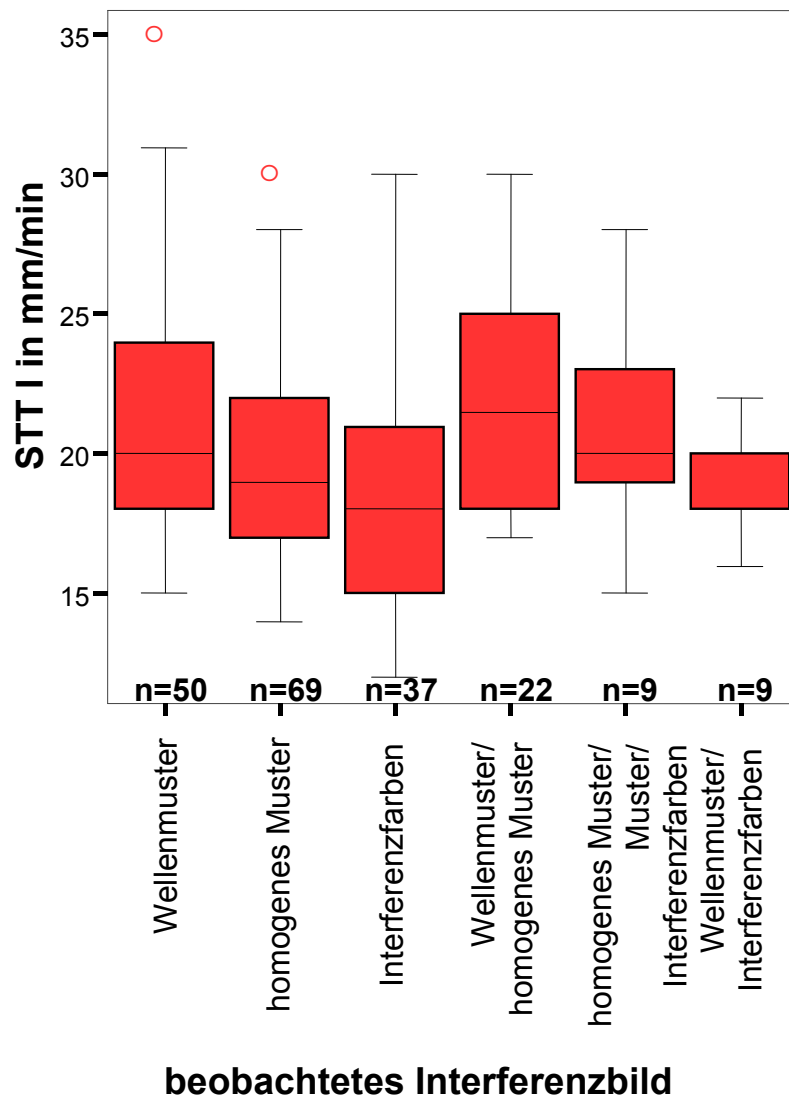


Abb. 19: Boxplot zur Darstellung der STT Werte innerhalb der beobachteten Interferenzmuster von allen untersuchten Augen (n= 196, ○= Ausreißer)

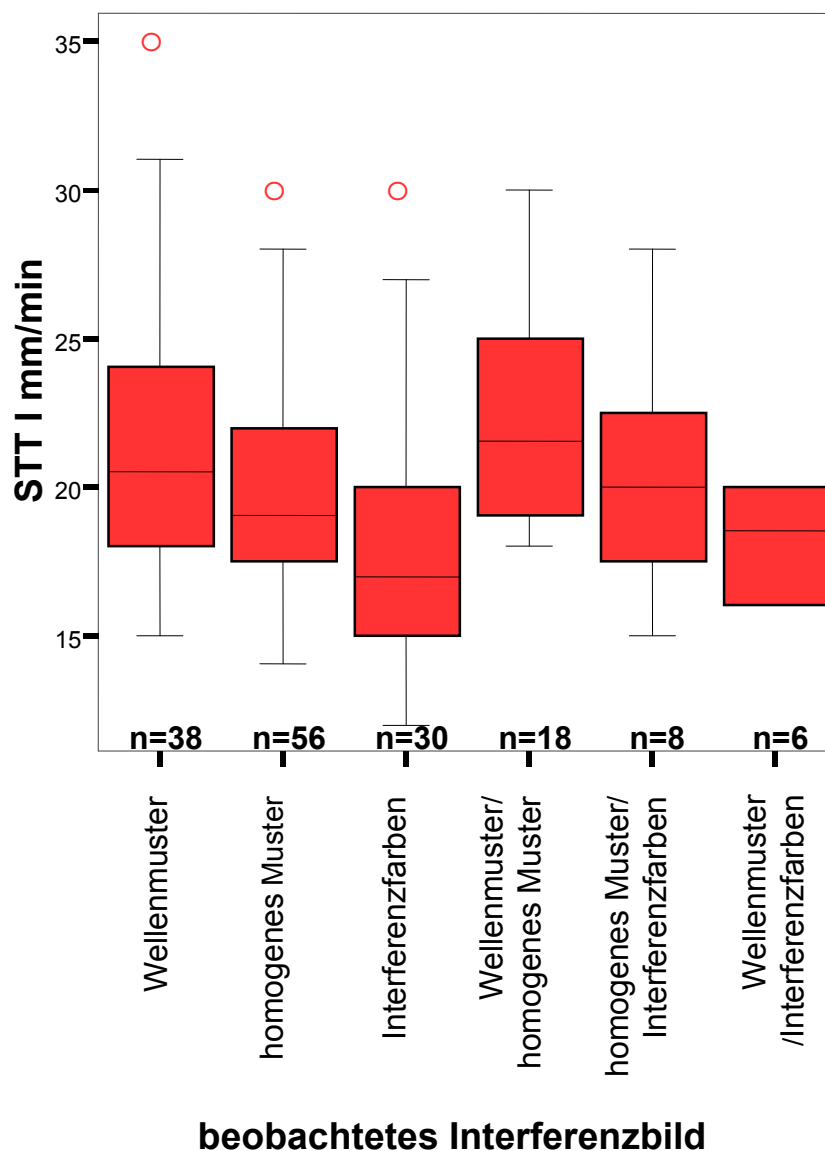


Abb. 20: Boxplot zur Darstellung der STT I Werte innerhalb der beobachteten Interferenzbilder aller untersuchten Augen unter der Bedingung OD = OS (n = 156, ○ = Ausreißer)

5.2.1.5 Betrachtung Interferenzen und Meibometrie

An 112 Augen wurde mittels Meibometrie der Lipidgehalt am Lidrand semiquantitativ erfasst. Die Ergebnisse, den beobachteten Interferenzbildern zugeordnet, sind in Tab. 14 dargestellt. Die Darstellung der Messwerte in Boxplots (s. Abb. 21 und Abb. 22) zeigt hinsichtlich der Meibometrie keine signifikanten Unterschiede zwischen den sechs

beobachteten Interferenzbildern (t-Test siehe Anhang Tab.12.9). Ein Zusammenhang bzw. eine Korrelation zwischen der Meibometrie und der Interferometrie konnte auch hier statistisch mittels t-Test für abhängige Stichproben nicht belegt werden, wobei der als signifikant angesehene p-Wert bei $< 0,05$ lag (Auflistung der einzelnen p-Werte s. Tab. 19).

Tab. 14: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der meibometrischen Messungen* innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzbild	Mittelwert	N	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
Wellenmuster	292,89	35	154,55	82,0	837,0
homogenes Muster	301,26	36	176,86	83,0	1089,0
Interferenzfarben	310,57	23	200,95	35,0	749,0
Wellenmuster/homogenes Muster	334,13	8	187,80	58,0	598,0
homogenes Muster/Interferenzfarben	118,50	2	6,36	114,0	123,0
Wellenmuster/Interferenz- farben	298,88	8	120,19	102,0	492,0
Insgesamt	299,47	112	170,40	35,0	1089,0

*Meibometrie in Meibom Units (MU)

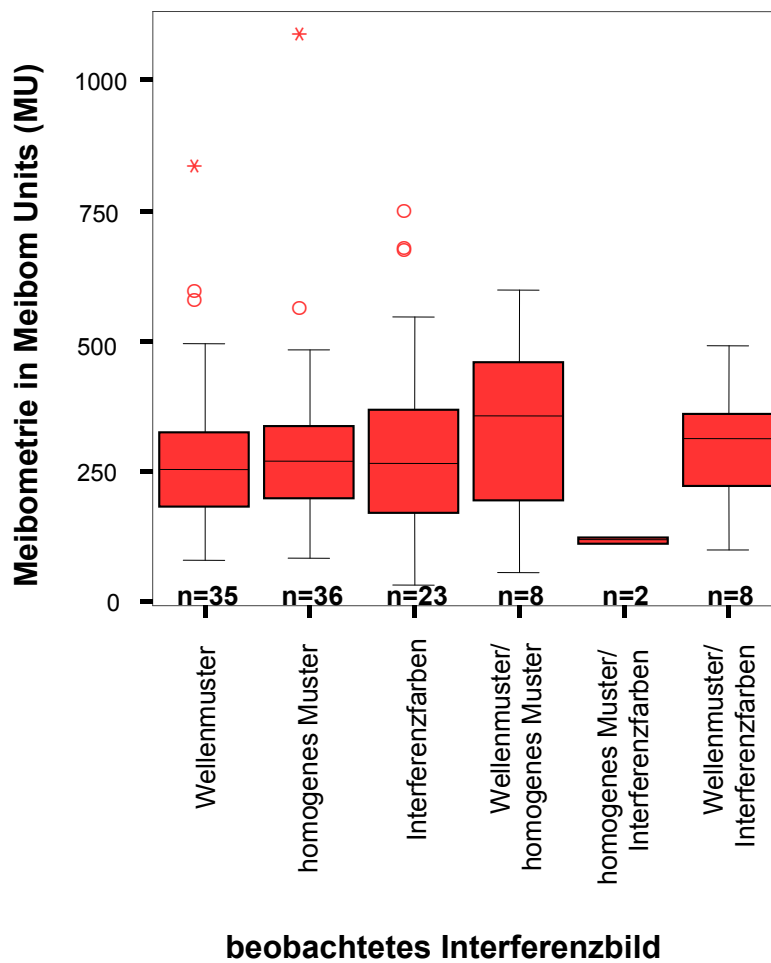


Abb. 21: Boxplot zur Darstellung der Meibometriewerte innerhalb der beobachteten Interferenzbilder aller untersuchten Augen (n=112, ○= Ausreißer)

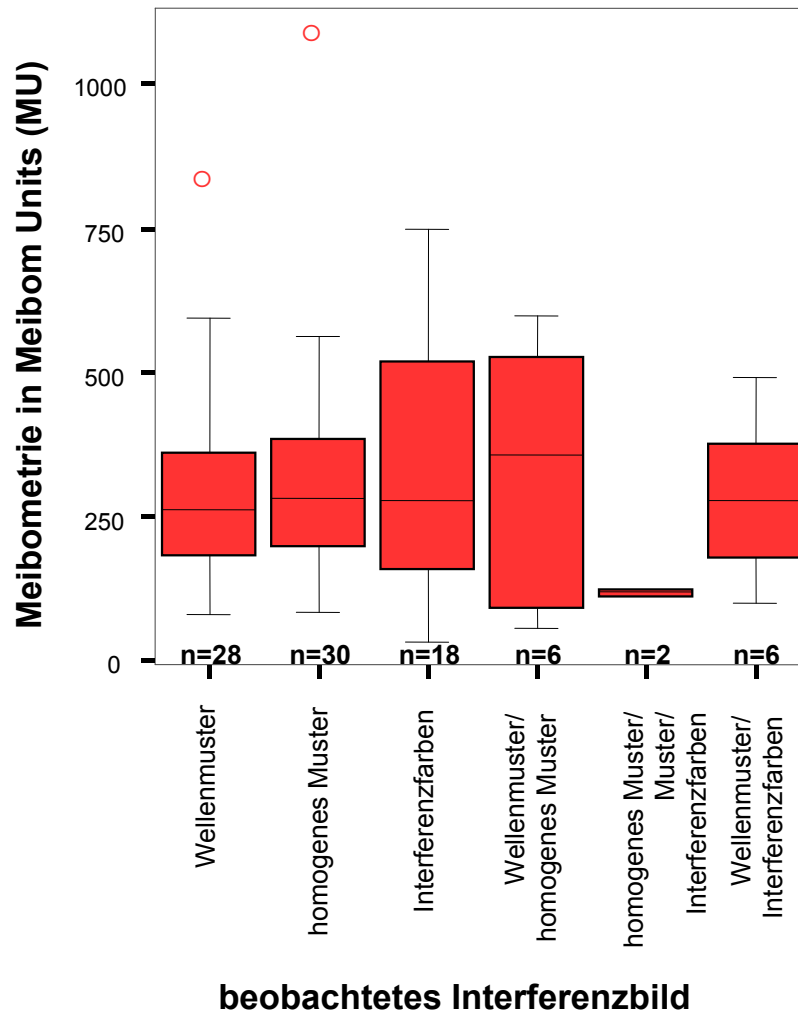


Abb. 22: Boxplot zur Darstellung der Meibometriewerte aller untersuchten Augen unter der Bedingung OD = OS (n= 90, ○= Ausreißer)

5.2.1.6 Betrachtung der Interferenzmuster und der Altersverteilung der Probanden

Das Durchschnittsalter der 98 Hunde betrug $4,72 \pm 2,95$ Jahre. In jeder der sechs beobachteten Interferenzgruppen war die Altersverteilung der Probanden ähnlich (s. Tab. 15) und nicht signifikant unterschiedlich.

Tab. 15: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung Alters* der Probanden innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzbild	Mittelwert des Alters*	N	Standardabweichung	Min	Max
Wellenmuster	4,4	50	2,9	1	10
homogenes Muster	4,7	69	2,8	1	10
Interferenzfarben	4,6	37	3,1	1	10
Wellenmuster/homogenes Muster	6,3	22	3,3	1	10
homogenes Muster/Interferenzfarben	3,1	9	2,2	1	8
Wellenmuster/Interferenzfarben	4,8	9	2,9	1	9
Insgesamt	4,7	196	2,9	1	10

*Alter in Jahren

5.2.1.7 Betrachtung der Interferenzmuster und der Geschlechtsverteilung der Probanden

Die graphische Darstellung (s. Abb. 23) zeigt deutlich, dass bestimmte Interferenzmuster sowohl bei weiblichen und männlichen als auch bei kastrierten Hündinnen und Rüden annähernd mit gleicher Verteilung auftreten. Graphisch lässt sich keine Korrelation zwischen dem Geschlecht und dem beobachteten Interferenzbild feststellen.

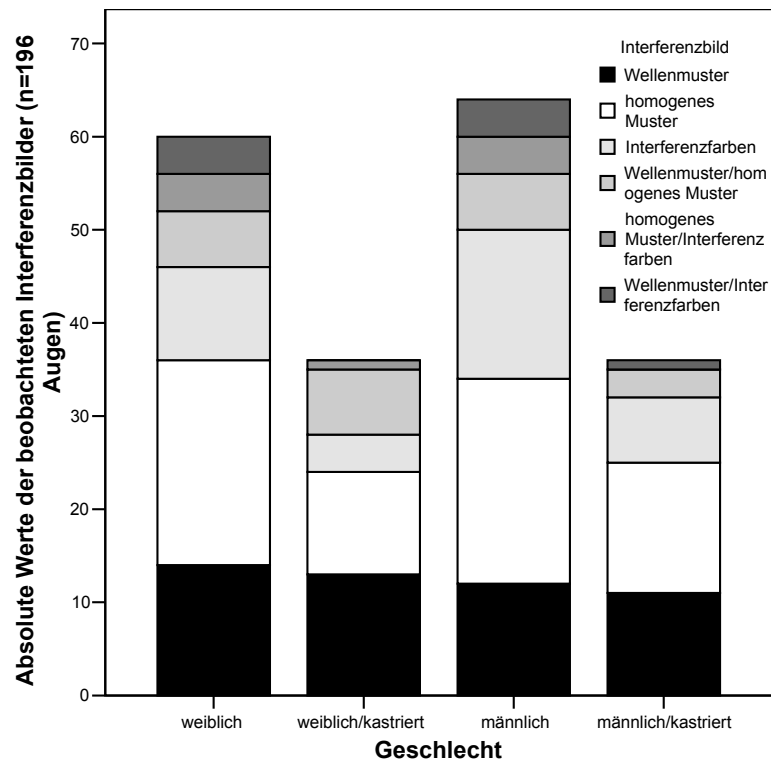


Abb. 23: Darstellung der Interferenzbilder und der Geschlechtsverteilung an n= 196 Augen

5.2.1.8 Betrachtung der Interferenzmuster und der Blutfettwerte

Es wurden Blutfettwerte (Cholesterin und Triglyceride) von 59 Hunden (118 Augen) hinsichtlich ihrer Verteilung in den sechs Interferenzgruppen untersucht (s. Tab. 16 und Tab. 17). Die Bestimmung der Blutfettwerte erfolgte im Labor der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin mittels Photometrie. Der Referenzbereich in diesem Labor liegt für das Cholesterin bei 131 und 303 mg/dl und für das Triglycerid bei 26 und 90 mg/dl. Zwischen den einzelnen Gruppen konnte weder bezüglich der Cholesterinwerte noch bezüglich der Triglyceridwerte der einzelnen Probanden ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tab. 16: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der Cholesterinwerte (mg/dl) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzbild	Mittelwert der Cholesterinwerte	N	Standardabweichung	Min	Max
Wellenmuster	246,4	28	88,7	153	465
homogenes Muster	213,1	47	53,7	147	343
Interferenzfarben	204,2	22	55,9	141	330
Wellenmuster/homogenes Muster	213,2	12	47,7	169	299
homogenes Muster/Interferenzfarben	169	2	0	169	169
Wellenmuster/Interferenzfarben	233,7	7	55,7	176	293
Insgesamt	219,8	118	64,6	141	465

Tab. 17: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung der Triglyceridwerte (mg/dl) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzbild	Mittelwert der Triglyceridwerte	N	Standardabweichung	Min	Max
Wellenmuster	70,8	28	70,1	24	386
homogenes Muster	62,9	47	55,1	22	386
Interferenzfarben	58,4	22	24,7	33	131
Wellenmuster/homogenes Muster	51,5	12	12,9	40	76
homogenes Muster/Interferenzfarben	37	2	0	37	37
Wellenmuster/Interferenzfarben	51,7	7	18,4	35	78
Insgesamt	61,6	118	50,2	22	386

5.2.1.9 Betrachtung der Interferenzmuster und des Schilddrüsenwertes T4

Der Schilddrüsenwert T4 (Thyroxin) wurde in einem Diagnostik-Labor (Laboklin GmbH & Co.KG) mit der Methode der Chemoluminiszenz (CLA) bestimmt. Der Referenzbereich für T4 laut Laboklin liegt bei 1,3 – 4,5 µg/dl. Die Aufteilung der gemessenen T4 Werte von 59 Hunden entsprechend der Interferenzgruppen sind in Tab. 18 dargestellt. Zwischen den

einzelnen Gruppen konnte, bis auf eine Ausnahme, kein signifikanter Unterschied bezüglich der T4 Werte festgestellt werden.

Tab. 18: Statistische Ergebnisse zur Untersuchung des Schilddrüsenwertes T4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) innerhalb der sechs beobachteten Interferenzmuster

Interferenzbild	Mittelwert des Schilddrüsenwertes T4	N	Standardabweichung	Min	Max
Wellenmuster	2,5	28	1,2	,6	4,7
homogenes Muster	1,9	47	1,2	,1	4,8
Interferenzfarben	2,7	22	0,8	1,2	4,8
Wellenmuster/homogenes Muster	2,2	12	1	,2	3,2
homogenes Muster/Interferenzfarben	2	2	0	2,0	2,0
Wellenmuster/Interferenzfarben	2,1	7	1,1	1,1	3,3
Insgesamt	2,3	118	1,1	,1	4,8

Referenzbereich laut Laboklin ® für T4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$): 1,3 – 4,5

Tab. 19: p-Werte der t-Tests für unabhängige Stichproben zwischen den beobachteten Interferenzbildern bezüglich des STT, der Meibometrie, des Alters und der Blutwerte T4, Cholesterin und Triglyceride

Int	3	4	5	7	8
4	STT:0,96 Mb.:0,76 Alter:0,72 T4:0,68 Chol:0,15 Tri:0,46				
5	STT:0,44 Mb.:0,19 Alter:0,99 T4:0,41 Chol:0,38 Tri:0,13	STT:0,36 Mb.:0,19 Alter:0,75 T4:0,2 Chol:0,82 Tri:0,33			
7	STT:0,94 Mb.:0,57 Alter:0,66 T4:0,98 Chol:0,2 Tri:0,1	STT:0,9 Mb.:0,55 Alter:0,44 T4:0,77 Chol:0,43 Tri:0,18	STT:0,66 Mb.:0,75 Alter:0,67 T4:0,4 Chol:0,44 Tri:0,09		
8	STT:0,95 Mb.: Alter:0,34 T4:- Chol:- Tri:-	STT:0,92 Mb.: Alter:0,37 T4:- Chol:- Tri:-	STT:0,76 Mb.: Alter:0,37 T4:- Chol:0,65 Tri:-	STT:0,98 Mb.: Alter:0,21 T4:- Chol:- Tri:-	
9	STT:0,17 Mb.:0,53 Alter:0,55 T4:0,95 Chol:0,57 Tri:0,22	STT:0,1 Mb.:0,78 Alter:0,64 T4:0,84 Chol:0,82 Tri:0,34	STT:0,11 Mb.:0,18 Alter:0,38 T4:0,42 Chol:0,97 Tri:0,32	STT:0,08 Mb.:0,39 Alter:0,37 T4:0,96 Chol:0,39 Tri:0,56	STT:0,13 Mb.: Alter:0,77 T4:- Chol:- Tri:-

(Abk. Int =Interferenzbild, 3= Wellenmuster, 4= homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 7= Wellenmuster/homogenes Muster, 8= homogenes Muster/Interferenzfarben , 9= Wellenmuster/Interferenzfarben, STT = Schirmer Tränen Test, Mb= Meibometrie, Chol= Cholesterin, Tri= Triglyceride, - = Wert nicht ermittelbar)

5.2.1.10 Betrachtung STT I und Meibometrie

Bei der graphischen Darstellung der Messergebnisse der Meibometrie eines Auges und des dazugehörigen STT I Wertes mittels Streudiagramm (s. Abb. 24) konnte kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern beobachtet werden. Sowohl bei sehr hohen als auch bei sehr niedrigen Meibometriewerten schwankte der STT I von ebenfalls sehr niedrig bis sehr hoch.

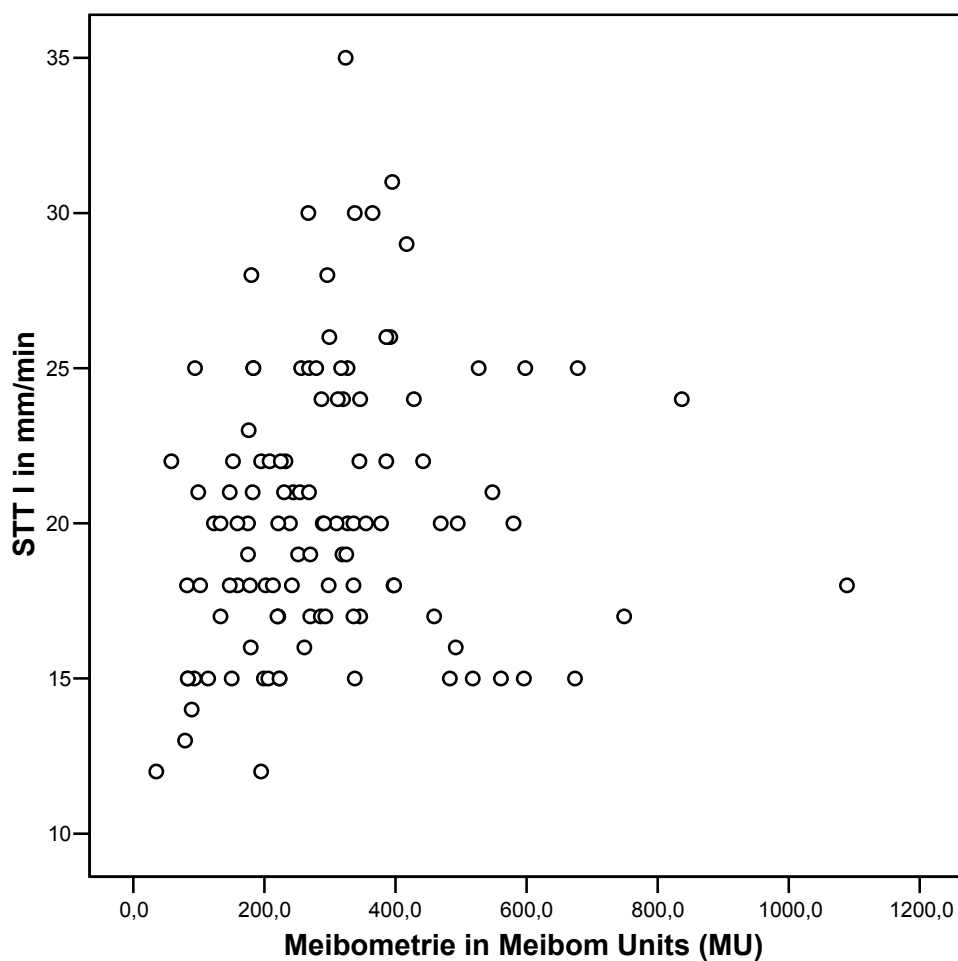


Abb. 24: Verteilung der STT I – Werte von Hundeaugen, bei denen Meibometrie durchgeführt wurde (n = 112)

5.3 Ergebnisse der biochemischen Lipidanalyse

Von 10 Hunden wurde MS mit dem Verfahren HPLC-MS nach Lipidgruppen aufgetrennt und im Anschluss charakterisiert. Das Durchschnittsalter der 10 Hunde betrug $5,4 \pm 2,99$ Jahre. Von jedem Tier konnte 0,1 bis 0,2 mg reinen MS gewonnen und zur Analytik genutzt werden. Aufgrund des hohen Aufwandes, den die biochemische Analyse des MS von 10 Hunden mittels HPLC-MS erfordert, wurde die chemische Struktur aller relevanten Lipide anhand der Probe eines Hundes (Do Khyi, Synonym Tibetischer Mastiff) charakterisiert. Das Lipidmuster dieser Probe entsprach stark den Lipiden der übrigen neun Proben. Wichtige Lipide (z. B. Cholesterol und seine Ester) wurden in allen 10 Proben charakterisiert [185].

Bei der Auftrennung des Sekrets in der NP-HPLC kam es (dem humanen MS sehr ähnlich) zu einem markanten chromatographischen Peak nach 3,2 – 3,5 Min, der für Wachsester, Cholesterolester sowie Triacylglyceride typisch ist. Ein weiterer deutlich schwächerer Peak erschien kurze Zeit später (nach ca. 5 – 6 Min) und ist charakteristisch für DAGs, Cholesterol und die bereits beschriebenen sog. OAHFAs ((O-acyl)-omega-hydroxy FS [8, 189]). In Bereichen, die typisch für Ceramide, FS und MAGs sind, wurden im caninen MS keine Peaks registriert. Die Ergebnisse der NP-HPLC sind in Abb. 25 (A) dargestellt. Im anschließenden fragmentierten Massenspektrum wurden bei einer m/z (Masse zu Ladung Verhältnis) von 369 (typisch für Cholesterol und Cholesterolester), 551 bis 673 (langkettige Wachsester), 729 – 785 (OAHFAs) und 900 bis 1100 (noch nicht genauer identifiziertes Lipid aufgrund mangelndem Standard) Peaks registriert. Alle Lipide hatten bei der Massenspektrometrie Signale, die dem humanen MS stark ähnelten (s. Abb. 25, C und D).

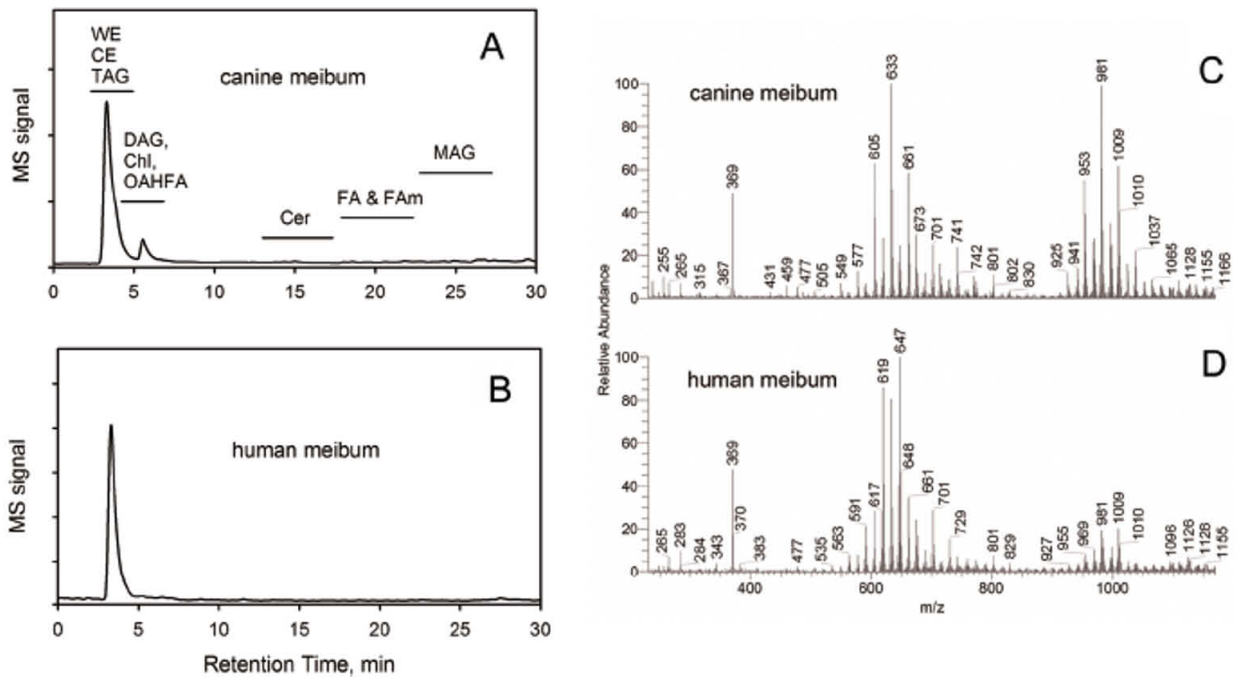


Abb. 25: Massenspektrogramm des caninen Meibom Sekrets (A und C) sowie des humanen Meibom Sekrets (B und C) [185]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im caninen MS gleiche Lipide detektiert werden konnten, die auch beim Menschen zu finden sind. Es gibt jedoch einige Unterschiede. Zum einen variiert die Quantität der Substanzen zwischen Mensch und Tier. Zum anderen zeigen die einzelnen Lipide leichte Abweichungen. Z. B. haben die Wachsester, die beim Hund gefunden wurden, als Bestandteil gesättigte Alkohole mit einer Kettenlänge von C_{23} bis C_{25} , während beim Menschen Kettenlängen von C_{24} bis C_{26} gemessen wurden. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse sind bereits publiziert, die detaillierten Ergebnisse sind in der Publikation zu finden [185].

5.4 Ergebnisse der Supplementierung mit essenziellen Fettsäuren

Nach einer vierwöchigen Fütterung der acht Probanden mit Viacutan® (s. Kap. 4.1.5) erfolgte eine erneute ophthalmologische Untersuchung sowie die interferometrische Betrachtung des TF und die meibometrische Messung. Die allgemeine und die Augenuntersuchung mit dem Spaltlampenbiomikroskop waren bei allen acht Hunden unauffällig. Die Messungen des STT I zeigten keine auffällig höheren oder niedrigeren Werte. Bei einem p-Wert von 0,8 konnte

durch den zweiseitigen gepaarten t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen dem errechneten Mittelwert aus der Reproduzierbarkeitsstudie und dem STT I Wert von Tag 28 festgestellt werden, wobei ein p-Wert von $<0,05$ als signifikant galt. Die Ergebnisse der Messung an Tag 28 sind in Tab. 20 aufgeführt.

Nach 28 Tagen Supplementierung mit essentiellen FS zeigte die Meibometrie sowohl am rechten als auch am linken Auge aller Probanden deutlich veränderte Werte. Das gemittelte Ergebnis aus der Wiederholbarkeitsstudie aller Probanden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten betrug $202,25 \text{ MU} \pm 44,75 \text{ MU}$, während der Mittelwert an Tag 28 bei $330 \text{ MU} \pm 37,95$ lag. Aus diesen Werten ergeben sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,05$ und ein p-Wert von $0,00000056$ (errechnet mittels zweiseitig gepaarten t-Test). Dieses deutet auf eine signifikante Veränderung der produzierten Menge an MS nach einer vierwöchigen oralen Supplementierung mit essentiellen FS hin (s. Tab. 21). Die graphische Darstellung der veränderten Messergebnisse nach 28 Tagen in Abb. 26 verdeutlicht den Anstieg um bis zu $141,24 \%$.

Die Beurteilung des TF mittels Interferometrie am Tag 28 ist in Tab. 22 dargestellt. Bei der Betrachtung wird deutlich, dass sich die Interferenzbilder trotz Supplementierung mit essentiellen FS bei keinem der acht Probanden deutlich verändert haben und in 6 Fällen sogar identisch mit vorangegangenen Messungen waren.

Tab. 20: Ergebnisse des STT I (angegeben in mm/Min) der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf), der Messung an Tag 28 (grau unterlegt) und der Mittelwert aus der Wiederholbarkeitsstudie jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS)

Proband	1		2		3		4		5		6		7		8	
	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS
Tag 1 (15:00 Uhr)	22	21	24	25	17	17	18	16	21	21	18	19	23	22	22	25
Tag 2 (15:00 Uhr)	20	18	25	23	18	18	17	19	22	21	19	20	25	23	17	18
Tag 3 (15:00 Uhr)	20	18	24	25	17	18	16	20	20	23	20	18	23	22	18	21
Tag 28	21	20	25	24	18	18	18	19	21	20	20	19	24	22	18	21
Mittelwert (Tag 1-3)	20.67	19	24.33	24.33	17.33	17.67	17.00	18.33	21.00	21.67	19.00	19.00	23.67	22.33	19.00	21.33

* Mittelwert aus Tag 1, 2, 3 (immer 15:00 Uhr)

Tab. 21: Ergebnisse der Meibometrie (angegeben in Meibom Units, MU) der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf), der Messung an Tag 28 (grau unterlegt) und der Mittelwert aus der Wiederholbarkeitsstudie jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS)

Proband	1		2		3		4		5		6		7		8	
Messung an	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS	OD	OS
Tag 1(15:00 Uhr)	208	268	312	279	220	133	102	176	230	182	213	175	176	152	225	183
Tag 2(15:00 Uhr)	145	272	234	379	214	218	190	124	214	152	261	145	275	270	123	159
Tag 3 (15:00 Uhr)	223	218	273	253	124	206	175	88	206	234	185	204	214	96	246	154
Tag 28	355	376	331	263	353	348	334	312	409	284	268	293	376	343	334	301
Mittelwert (Tag 1, 2, 3)	192.00	252.67	273.00	303.67	186.00	185.67	155.67	129.33	216.67	189.33	219.67	174.67	221.67	172.67	198.00	165.33

* Mittelwert aus Tag 1, 2, 3(immer 15:00)

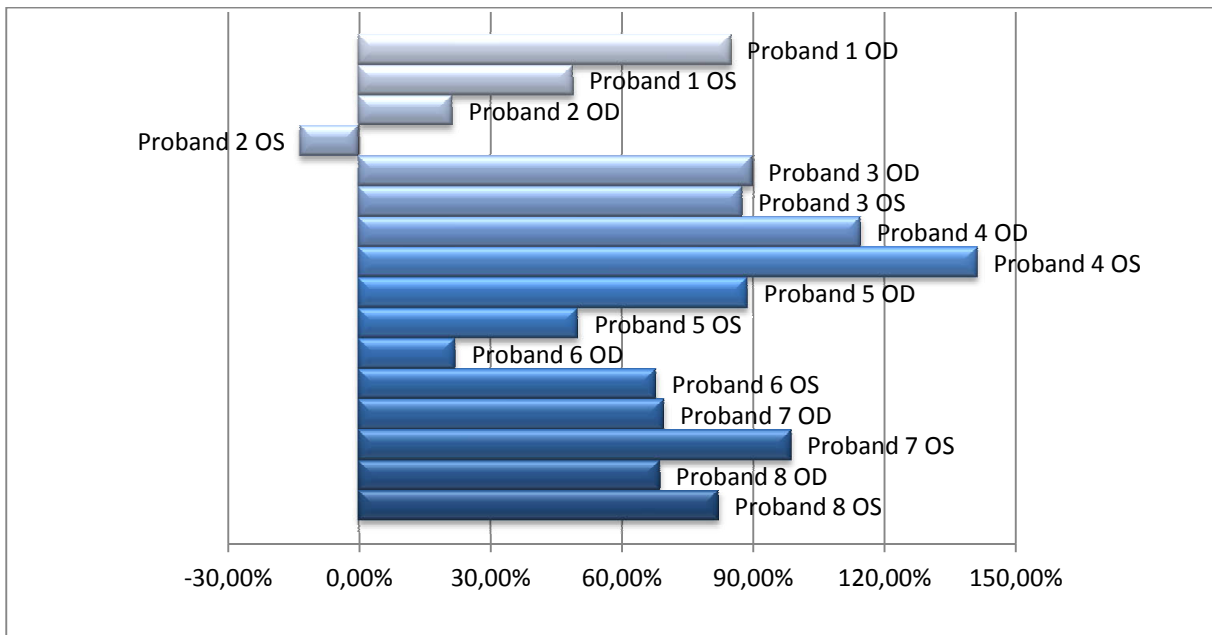


Abb. 26: Prozentuale Veränderung der Meibometriewerte nach 28 Tagen Supplementierung mit essentiellen FS im Vergleich zum Mittelwert aus Tag 1 bis 3 (n=16 Augen)

Tab. 22: Darstellung der beobachteten Interferenzbilder der Wiederholbarkeitsstudie (Wochenverlauf) und der Interferenzbilder an Tag 28 (grau unterlegt) jeweils am rechten (OD) und linken Auge (OS)

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8
Messung an	OD OS	OD OS	OD OS	OD OS	OD OS	OD OS	OD OS	OD OS
Tag 1 (15:00 Uhr)	4 4	3 3	3 3	9 9	3 5	5 3	3 3	3 3
Tag 2 (15:00 Uhr)	4 4	3 3	5 3	5 9	3 3	3 5	3 3	3 3
Tag 3 (15:00 Uhr)	3 4	3 3	5 5	5 5	9 5	3 5	3 3	3 3
Tag 28	4 4	3 3	5 5	5 5	3 3	3 3	3 3	9 3

(3= Wellenmuster, 4 = homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 9= Wellenmuster/Interferenzfarben)

6 Diskussion

Die Lipidschicht (LS) des Tränenfilms (TF) trägt entscheidend zur Augengesundheit und folglich einem physiologischen Visus bei. Eine unzureichende Produktion (quantitativer Mangel; Hyposekretion) oder eine gestörte Komposition der sezernierten Lipide (qualitativer Mangel) können unterschiedliche Augenerkrankungen zur Folge haben, u.a. das Krankheitsbild der Keratokonjunktivitis sicca (KCS) [2, 53, 81, 106, 109, 111, 132]. Forschung hinsichtlich der Zusammensetzung, der biochemischen Analyse und der Diagnostik der LS beschränkte sich bis dato auf wenige Spezies, v. a. den Menschen, verschiedene Nager, Primaten und Rinder [14, 16, 87, 88, 108, 153, 154, 159]. In Anbetracht der Inzidenz des Hundes von 5 -35 % an KCS zu erkranken [112, 177, 190-192], haben sich bisher nur wenige Arbeiten mit der LS als ursächlichem Faktor für das „trockene Auge“ und insbesondere eines „evaporative dry eye“ (EDE) des Hundes sowie möglichen diagnostischen Verfahren beschäftigt [36, 109, 149-151, 193]. Diese Lücke zu schließen bzw. Grundlagendaten über die LS des TF beim Hund zu sammeln, war Ziel dieser Studie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich gesunde Tiere unterschiedlichen Alters und unterschiedlichen Geschlechts untersucht. Bei allen Tieren handelte es sich um Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin. Die wichtigsten Einschlusskriterien für diese Studie waren zum einen eine klinisch diagnostizierte Allgemein- und Augengesundheit, zum anderen das Alter. Schließlich belegen zahlreiche Arbeiten aus der Humanmedizin qualitative und quantitative Veränderungen der LS bei sehr jungen und sehr alten Menschen [9, 176].

Im Hauptprojekt wurden insgesamt 98 gesunde Hunde untersucht. Bei allen 98 Tieren wurde die Interferometrie, bei 56 von 98 Hunden die Meibometrie und bei 59 von 98 Blutfette sowie T4 bestimmt, bei 59 von 98 wurde Meibom Sekret (MS) gewonnen (von diesen wurden 10 Proben MS biochemisch analysiert) (s. Tab. 8, Kapitel 5.2). Die Schwankungen in der Probandenzahl hinsichtlich der einzelnen Untersuchungen ergaben sich u.a. aus der Tatsache, dass die Blutparameter nur bestimmt werden konnten, wenn dem Patienten zu anderen diagnostischen Zwecken Blut entnommen wurde. MS wurde nur dann entnommen, wenn der Patient zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken einer Anästhesie unterzogen wurde, gleiches galt für die Meibometrie. Dank eines vorangestellten Pilotprojekts an mehr als 30 Tieren, welches dem geübten Umgang mit den Methoden diente, konnte ein standardisierter

und weitestgehend einheitlicher Untersuchungskanon gewährleistet werden. Dem Hauptprojekt vorangegangen war eine Studie an acht allgemein- und augengesunden Tieren, in der die Reproduzierbarkeit der Interferometrie und der Meibometrie verifiziert werden sollte. Im Anschluss an das Hauptprojekt folgte eine „Spin-off“-Studie an acht Probanden, die den Einfluss einer diätetischen Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren (FS) auf die LS des TF überprüfen sollte.

Die weitere Diskussion soll die Ergebnisse dieser Studie sowie das Design der Studie selbst kritisch reflektieren und mögliche Fehlerquellen aufdecken. Dabei wird zunächst die Interferometrie in ihrer Praktikabilität am Tier, ihre Reproduzierbarkeit und Zusammenhänge mit anderen Ergebnissen dieser Studie diskutiert. Das gleiche gilt für die Meibometrie. Zuletzt sollen die Ergebnisse der Lipidanalyse und der Supplementierungsstudie näher betrachtet werden.

Interferometrie

Das physikalische Phänomen der Interferometrie zur Beurteilung der LS ist in der Humanmedizin schon lange etabliert [2, 115, 137, 138, 145-147, 176, 194-196]. Auch in der Veterinärmedizin sind 1987 erste und in den letzten Jahren erneut Beobachtungen am Hundeauge mittels Interferometrie durchgeführt worden [36, 193]. Die Untersuchungen 1987 durch Carrington et al. wurden jedoch mit einem großen, relativ unhandlichen und daher nicht praxistauglichen Gerät durchgeführt [36]. Der geringe Umfang an wissenschaftlichen veterinärmedizinischen Arbeiten förderte eine der interessantesten Fragestellungen dieser Arbeit, nämlich inwieweit das neue portable, in der Handhabung einfachere und zudem kostengünstigere Gerät Tearscope-plus® auch in der Veterinärphthalmologie angewendet werden kann und ob es am Tier ebenso viel Aussagekraft zur LS bietet wie am Menschen. Nach einer Pilotstudie an einer kleinen Tieranzahl [193] konnte mit dieser Arbeit erstmalig an einer großen Probandenzahl untersucht und belegt werden, dass die Interferometrie mittels Tearscope-plus® eine am Hund gut anwendbare Methode zur Beurteilung der präokulären LS ist.

Die helle Weißlichtquelle des Gerätes und der nahe Kontakt zum Hundeauge wurden von allen Probanden ausnahmslos gut geduldet (s. Abb. 6 Kapitel 4.2.4), u.a. vermutlich weil die Befunderhebung nur wenige Sekunden in Anspruch nimmt. Moore et al. haben gezeigt, dass

der TF auf der Augenoberfläche des Hundes, gemessen mittels TFBUT, nahezu 20 Sekunden stabil bleibt [40]. Dieses Zeitfenster reicht dem Untersuchenden völlig aus, um die LS beurteilen zu können, ohne dass sich das Muster stark verändert. Das reflektorische Blinzeln der Augenlider oder das Kneifen ließ sich nicht immer vermeiden und dieses führte zu einem sich veränderndem Interferenzbild. In diesem Fall wurde der TF nach einer kurzen Ruhephase erneut begutachtet.

Einzig die Interpretation der Befunde muss kritisch hinterfragt werden. Denn es gibt für den Hund, im Gegensatz zum Menschen keine Abbildungstafeln oder Tabellen. In dieser Studie wurden alle Hunde von einer Person untersucht und die beobachteten Interferenzmuster im Protokoll notiert. Somit könnte die Objektivität des Untersuchers kritisch hinterfragt werden. Alle beobachteten Muster entsprachen den von Guillon et al. etablierten Mustern, wie sie auch an der LS des menschlichen TF registriert werden [138, 144]. So wurden vornehmlich Wellenmuster (analog zu Guillon et al. als Muster 3 bezeichnet), homogene Muster (Muster 4) und Interferenzfarben (Muster 5) beobachtet. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da sich ein physikalisches Phänomen speziesunabhängig verhält. Bestimmte Schichtdicken einer LS, unabhängig von der Quelle (z. B. Ölteppich auf dem Meer oder LS auf der wässrigen Phase des TF), werden abhängig von der Dicke als bestimmte Interferenzmustern und -farben sichtbar [141]. Bestimmte Interferenzmuster, die in der Humanmedizin regelmäßig beobachtet werden, wurden in dieser Studie am Hund nicht beobachtet. Wiederum wurden am Hund gelegentlich zwei Interferenzmuster in ein und demselben Auge beobachtet und in dieser Arbeit mit dem Interferenzmuster 7 (Muster 3 und 4), 8 (Muster 4 und 5) und 9 (Muster 3 und 5) beschrieben. Die Mischbilder wurden nur dann als solche notiert, wenn sie zu gleichen Teilen sichtbar wurden. Geringe Abweichungen wurden vernachlässigt und der Einfachheit halber dem ausgeprägteren Muster zugeordnet.

Warum bestimmte Bilder (Interferenzmuster 1, 2 und 6) beim Hund nicht beobachtet wurden, kann verschieden erklärt werden: erstens durch die Augengesundheit der Probanden dieser Studien, zweitens durch den Größenunterschied zwischen der caninen und humanen Hornhaut und der Lidspalte und zuletzt aufgrund der Unterschiede in der biochemischen Komposition der LS bei Hund und Mensch.

Ad 1) Die Interferenzmuster 1 und 2 werden bei einer sehr dünnen LS sichtbar, deren Dicke etwa 13 – 50 nm beträgt. Mittels Interferometrie wird die dünne LS als sehr dünnes bis weites

Maschenwerk sichtbar [138, 147]. Menschen, die das Interferenzmuster 1 oder 2 aufweisen haben zum Teil bereits Symptome des „trockenen Auges“ oder die Tendenz, daran zu erkranken. Diesen Patienten wird das Tragen von Kontaktlinsen nicht empfohlen [147]. Bei den Probanden dieser Arbeit handelte es sich um klinisch gesunde Tiere, bei denen dank der Voruntersuchung mittels Spaltlampenbiomikroskopie und STT I Symptome des „trockenen Auges“ ausgeschlossen werden konnten. Das würde erklären, dass diese Hunde eine dickere LS von 50 – 180 nm hatten, wie sie durch die Muster 3 bis 5 präsentiert wird [147]. Das Interferenzbild 6 wird beim Menschen einer abnormen LS zugeordnet, welche sich durch sehr unregelmäßige Muster bis hin zu linsenförmigen Fettinseln präsentieren kann. Dieses wird bei Patienten mit einer MGD (u.a. durch veränderte Fettkomposition) oder an durch Cremes oder Kosmetika verunreinigten Augen beobachtet [138, 147]. Vor allem letzteres konnte bei den Hunden ausgeschlossen werden. Doch auch klinisch zeigte keiner der Patienten eine Veränderung im Bereich der MD, die einen Hinweis auf eine MGD geliefert hätten, wie sie in einer aktuellen Arbeit an der Freien Universität Berlin beschrieben wurden [118].

Ad 2) Weshalb im Gegensatz zu Arbeiten aus der Humanmedizin in dieser Arbeit Mischbilder beobachtet wurden, kann verschieden begründet werden. Zum einen damit, dass in der Humanmedizin keine Mischbilder auftreten, schließlich sind sie in keiner Literatur beschrieben. Oder es kann versucht werden, im Größenunterschied der Hornhaut und der Lidspalte beider Spezies eine Erklärung zu finden. Die Hornhaut des Hundes hat im Verhältnis zu der des Menschen einen deutlich größeren Durchmesser, denn sie macht etwa 1/5 der Bulbusoberfläche aus [38]. Während er beim Menschen $11,50 \text{ mm} \pm 1,5 \text{ mm}$ [197] beträgt, liegt der horizontale Durchmesser der caninen Hornhaut je nach Rasse bei 13 bis 17 mm [38]. Der vertikale Durchmesser ist geringfügig kleiner. Die LS des TF entsteht, indem sezerniertes MS mithilfe der Lider auf der Hornhaut verteilt wird und sich innerhalb des dreiphasigen TF als äußerste Schicht aufbaut. Je größer die zu benetzende Oberfläche und der Abstand zwischen Ober- und Unterlid ist, desto stärker wird die sezernierte Menge Lipid auseinander gezogen, was physikalisch zu einer dünner werdenden Schicht oder zumindest zu einer schlechteren Durchmischung bzw. Verteilung der Lipide führt. So könnte angenommen werden, dass bei einer großen Oberfläche (in diesem Fall die Kornea) die physikalischen Fähigkeiten der Lider und die chemischen Wirkmechanismen zwischen den einzelnen Fettmolekülen nicht genügen, um auf einer relativ großen Hornhaut eine homogene LS zu erzeugen oder aufrechtzuerhalten. Die Folge ist, dass zum Teil verschiedene

Interferenzmuster sichtbar werden. Dieses Phänomen wird auch an großen Seifenblasen oder Ölteppichen auf Wasser beobachtet, es werden viele unterschiedliche Interferenzen erzeugt. Diese variieren je nach Dicke der Substanz, da das Fett nicht überall gleichmäßig verteilt ist [198].

Ad 3) Ein weiterer Erklärungsversuch sind die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Lipide des menschlichen und des caninen MS. Erste Untersuchungen, die einen Bestandteil dieser Arbeit darstellen, belegen, dass das MS des Hundes qualitativ zwar stark dem des Menschen ähnelt, es aber zum Teil große quantitative Unterschiede gibt [172, 185]. Jedoch wären weitere biochemische und physikalische Studien notwendig, die diese Hypothese prüfen.

Verglichen mit der prozentualen Häufigkeit der verschiedenen Interferenzmuster beim Erwachsenen (Muster 1 und 2 bei 29,4%, Muster 3 bei 29,4%, Muster 4 bei 19,6 % und Muster 5 bei 17% der Bevölkerung) [147], ist das in dieser Arbeit häufigste beim gesunden Hund beobachtete Interferenzmuster das Muster 4 (homogenes/amorphes Muster). Es wurde bei 35,2 % der Hunde beobachtet, gefolgt vom Wellenmuster (Muster 3, 25,5%) und den Interferenzfarben (Muster 5, 18,9 %). Ein homogenes Interferenzbild bedeutet eine sehr stabile, gut durchmischte LS. Diese Beobachtung könnte einerseits ebenfalls mit der chemischen Komposition der Lipide beim Hund begründet werden (s.o.), würde aber der Hypothese von der relativ großen Hornhaut und somit der schlechteren Durchmischung der Lipide widersprechen.

Zum anderen lässt sich diese Beobachtung durch die, verglichen mit der des Menschen, deutlich reduzierten Blinzelrate des Hundes erklären. Lawrenson et al. untersuchte 2005 die Blinzelrate von Säuglingen und Kleinkindern und betrachtete dabei die Morphologie der LS. Dabei stellte er fest, dass mit zunehmenden Alter (in Wochen) die Blinzelrate deutlich zunimmt, während sich das Interferenzbild deutlich zu einer dünner werdenden LS hin verändert [176]. Bei Erwachsenen beträgt die Blinzelrate 17 pro Minute [199]. Übernimmt man diese Beobachtung, so würde sich die niedrige Blinzelrate des Hundes von gerundet 14 pro Minute (13,7/Min [200], 14,2/Min [36]) mit den Ergebnissen dieser Arbeit erklären lassen. Je dicker die LS, desto geringer die Blinzelrate. Denn eine wichtige Funktion der präokulären LS ist es, die vorzeitige Evaporation der darunter liegenden wässrigen Phase zu

verhindern und so die Augenoberfläche vor dem Austrocknen zu schützen. Je dicker und stabiler die LS ist, desto langsamer die Verdunstung.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit zur Reproduzierbarkeit der Interferenzen mittels Tearscope-plus®, so kann die Reproduzierbarkeit statistisch nicht nachgewiesen werden. Es besteht jedoch eine Tendenz, die für eine Reproduzierbarkeit spricht. Bei zwei von sechs untersuchten Hunden wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten in beiden Augen stets gleiche Interferenzbilder beobachtet. Bei den vier anderen Hunden wurde in demselben Auge höchstens zwei unterschiedliche Muster beobachtet (s. Tab.2 Kapitel 4.2.). Dabei handelte es sich bei dem abweichenden Muster um ein Mischbild, welches das andere, bereits beobachtete und protokollierte Interferenzmuster beinhaltete. Chew et al. zeigte mittels Meibometrie, dass sich beim Menschen die Lipidmenge im Tagesverlauf verringert. So ist morgens deutlich mehr MS vorhanden [104]. Dieses Phänomen konnte an den acht Tieren nicht beobachtet werden. Es gab im Verlauf des Tages keine Tendenz zu einer dünner werdenden LS und auch keine Abnahme der Messwerte aus der Meibometrie, die für eine verringerte Menge MS sprechen würden.

Die gemessenen STT I Werte und die beobachteten Interferenzwerte sowohl in der Studie zur Reproduzierbarkeit als auch im Hauptprojekt zeigen einen interessanten, wenn auch nicht statistisch greifbaren, Zusammenhang auf. Graphisch lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen (s. Kap. 4.4. und 5.1.4.). Mit zunehmender Dicke der LS sinken die gemessenen STT I Werte. Diese Beobachtung könnte implizieren, dass bei einer dickeren LS die Produktion der wässrigen Phasen entweder reduziert ist oder aber die aufliegende LS die wässrige Phase daran hindert, abzufließen. Fließt weniger wässrige Phase ab, wird auch eine geringere Tränenproduktion mittels STT I gemessen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass ein Tränenmangel vorliegt. Im Gegenteil, schließlich bleibt der TF u.a. dank der LS länger stabil und gewährleistet so die anhaltende Befeuchtung der Augenoberfläche.

Meibometrie

Einen weiteren großen Bestandteil dieser Arbeit stellte die quantitative Untersuchung des MS mittels Meibometrie dar. Dieses aus der Dermatologie übernommene Verfahren ist in der Humanophthalmologie schon lange etabliert und stellt einen festen Bestandteil des Untersuchungsprotokolls zum „trockenen Auge“ und der MGD dar [2, 54, 104]. Durch

Umrechnung der gemessenen MU kann ein Rückschluss auf die am Auge vorliegende Lipidmenge gezogen und so u.a. eine MGD diagnostiziert werden. Auch in der Veterinärmedizin wurde diese Methode bereits untersucht, wobei es sich in einer Studie um 42 [151] und einmal um 10 Hunde [150] handelte. Wie bei Ofri et al. [151] und Benz et al. [150] waren auch in dieser Arbeit die gemessenen Werte deutlich höher als beim Menschen gemessene Werte (141 MU) [54, 104]. Aber auch gegenüber den Messwerten von Benz et al. (211 ± 48 MU im rechten Auge, 205 ± 41 MU im linken Auge) und Ofri et al. (179 ± 60 MU) sind die Werte dieser Arbeit deutlich höher mit einer hohen Standardabweichung ($299,47 \pm 170,4$ MU, s. Kap. 5.2.1.3.) Diese Abweichung von vorangegangenen Studien lässt sich zum einen durch die Handhabung des Gerätes in dieser Studie erläutern (1.) und zum anderen durch das Patientengut (2.).

Ad 1) Ofri et al. haben ein älteres Gerät genutzt, welches das Ergebnis der Messung direkt anzeigte. Weiterhin wurde bei Ofri et al. jedes Tier nur einmalig untersucht und die Schlaufe auch nur einmal durch die photometrische Einheit gezogen. Ob die Messungen durch ein und denselben Untersucher durchgeführt wurden, ist nicht angegeben. Die Trocknungszeit betrug 30 Minuten bevor die photometrische Messung durchgeführt wurde [151]. Benz et al. benutzten das gleiche Gerät, wie es auch in dieser Arbeit Anwendung fand (das Meibometer MB 550), wobei die Messungen von zwei verschiedenen Untersuchern durchgeführt wurden und die Trocknungszeit der Schlaufe auf nur 1 Minute reduziert wurde [150]. Wie lange die Trocknungszeit betragen sollte, um alle wässrigen Anteile auf der Messfolie verdunsten zu lassen, ist in der Literatur unterschiedlich oder gar nicht angegeben [54, 104, 173]. Die Trocknungszeit der Schlaufen in dieser Arbeit betrug wie schon bei Ofri et al. 30 Minuten. Schließlich sind Lipide nicht flüchtig und ihre Menge nimmt mit zunehmender Trocknungszeit nicht ab, ein zusätzlicher wässriger Flüssigkeitsspiegel auf dem Teststreifen könnte die Messung jedoch negativ beeinflussen (beim Entnehmen des MS vom Lidrand lässt sich die gleichzeitige Aufnahme von Anteilen der wässrigen Phase des TF nicht verhindern). Im Gegensatz zu den zwei genannten Arbeiten wurde die photometrische Messung je Schlaufe fünfmal hintereinander durchgeführt und das Ergebnis gemittelt, um Ausreißer eliminieren zu können. Denn schon die kleinste Veränderung in der Zugkraft, der Schnelligkeit und dem Winkel, in dem die Schlaufe durch die photometrische Einheit gezogen wird, reichen aus, um das Messergebnis signifikant zu verändern. Zwar wurde auch in dieser Arbeit darauf geachtet, die Schlaufen stets gleich zu bewegen, aber wie es auch die vorher

genannten Autoren kritisieren, muss ein gewisser methodischer Fehler auch hier in Betracht gezogen werden.

Die Meibometrie mit dem Meibometer MB 550 (Courage + Khazaka electronic GmbH) hat viele Schwachstellen, die eine stets gleiche Messung und somit repräsentative Ergebnisse nur wenig verlässlich garantieren können. Zum einen werden die Schlaufen, die sich nach Anlegen an das Augenlid mit MS vollsaugen, nicht vom Hersteller geliefert. Der Untersuchende muss die Messfolie mithilfe eines Lineals aus einem gelieferten Schlaufenband selbst herstellen (Benz et al. haben das Prozedere in ihrer Arbeit detailliert geschildert [150]). Allein bei diesem Schritt können zahlreiche Fehler unterlaufen, denn weder das Lineal noch die Kraft des Tackers (mit je einer Heftklammer wird die Schlaufen an zwei Stellen fixiert) sind geeicht. Ein weiterer Punkt ist die Probenentnahme selbst. So soll laut Hersteller die Schlaufe ohne Druck für fünf Sekunden an das Unterlid gehalten werden, um Lipid aus den Öffnungen der Meibom Drüse aufzunehmen. Jedoch ist auch dieser Schritt von Patient zu Patient und Untersucher zu Untersucher abhängig vom Temperament und der Lidgröße des Tieres, sowie der Fähigkeit des Untersuchers, nicht immer in gleicher Form durchführbar.

Ad 2) Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die Messungen in dieser Arbeit an sedierten Tieren durchgeführt wurden, kurz bevor diese eine Narkose erhielten. Diese Patienten hatten keinen eventuellen reflexbedingten Blepharospasmus, drehten den Kopf nicht weg und übten durch eine Vorwärtsbewegung des Kopfes keinen Druck auf die Schlaufe aus. Diese Punkte könnten ein Messergebnis verfälschen. Stattdessen konnte das Unterlid gut evertiert und die Schlaufe für fünf Sekunden genau dort platziert werden, wo die Öffnungen der MD sichtbar waren. Allein die Möglichkeit, die Schlaufe präzise dort anlegen zu können, wo das MS austritt, könnte als Erklärung für die deutlich höheren Messwerte dieser Arbeit ausreichen.

Die Reproduzierbarkeit der meibometrischen Messung mit dem Meibometer MB 550 konnte in dieser Studie weder im Tages- noch im Wochenverlauf statistisch belegt werden. Dieses könnte am Studiendesign liegen. Die Messungen erfolgten an einer sehr kleinen und heterogenen Probandenzahl mit je drei Wiederholungsmessungen für den Tagesverlauf und den Wochenverlauf. Die Probandenzahl von acht wird für eine statistische Analyse zwar als ausreichend angesehen (Minimum sind 7 Tiere), muss jedoch bei einem Testverfahren mit zahlreichen Fehlerquellen, wie sie bei der Meibometrie möglich sind, als unzureichend

angesehen werden. Gemessene Schwankungen von bis zu 200 MU besitzen bei demselben Patienten in einer größeren Gruppe und bei häufigeren Wiederholungsmessungen nicht die gleiche Aussagekraft. Dennoch zeigt auch diese Studie zur Reproduzierbarkeit, wie auch schon in vorangegangenen Arbeiten [150, 151], Schwachstellen des Gerätes auf, die zum jetzigen Zeitpunkt wissenschaftlich fundierte Aussagen nicht zulassen.

Biochemische Analyse des caninen Meibom Sekrets

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig MS des Hundes nach einem in der Humanmedizin beschriebenen und etablierten Verfahren [15, 16, 84, 159, 201] zum Zweck der biochemischen Analyse entnommen und untersucht. Das Probenmaterial stammte von 10 Tieren unterschiedlichen Alters, Rassen und Geschlechts. Trotz der Heterogenität der untersuchten Gruppe wurden in allen Proben gleiche Komponenten nachgewiesen. Erste Ergebnisse weisen auf eine große qualitative Ähnlichkeit der Lipide im caninen und humanen MS hin, jedoch sind quantitativ Unterschiede festgestellt worden [185]. Bemerkenswert ist, dass in allen Proben Moleküle gefunden werden konnten, die zuvor auch schon beim Menschen und Stier nachgewiesen wurden (i.e. langkettige Cholesterolester, Wachsester, OAHFAs [8]) [202], wobei der Hund eine höhere Ratio von OAHFAs besitzt als der Mensch [185]. Da angenommen wird, dass sich OAHFAs aufgrund ihres amphiphilen Charakters zwischen die wässrige Phase des TF und den nicht polaren Fetten der LS legen [8] und die LS dadurch stabilisieren, könnten sie die Erklärung für die niedrigere Blinzelrate des Hundes liefern [185].

Zwar konnte ein Großteil der Lipide im caninen MS identifiziert werden, aber ebenso wurden bei der Chromatographie Peaks in Bereichen beobachtet (z. B. m/z 900 – 1100), die keinem Lipid zugeordnet werden konnten. Allerdings ist der zuvor erwähnte Peak auch im MS des Menschen registriert worden und kann ebenfalls nicht zugeordnet werden, da z.Zt. der entsprechende Standard fehlt. Dieses trifft im Übrigen auch für zahlreiche andere Lipide zu.

Supplementierung mit essentiellen Fettsäuren

Bei der Recherche zu dieser Arbeit fielen fortwährend Studien aus der Humanmedizin auf, die sich mit der Supplementierung mit essentiellen FS als Therapieansatz für das „trockene

Auge“ beschäftigten [181, 182, 203]. Neben vielen weiteren bestätigen die Arbeiten die positive Wirkung von essentiellen FS auf den TF und insbesondere die LS. Aufgrund der Themenrelevanz war es Grund genug, die Effektivität besonderer Öle auch in diesem Projekt zu betrachten. Die acht Hunde, die zur Überprüfung des Einflusses von besonderen Ölen auf die LS zur Verfügung standen, nahmen zu diesem Zweck über 28 Tage ein frei erhältliches Fütterungsergänzungsmittel ein. Über den Zeitraum der Studie wurden die Fütterungs- und Haltungs- bzw. Pflegegewohnheiten der Besitzer beibehalten, um eine Einflussnahme anderer Faktoren zu verhindern. Neben der Tatsache, dass am Ende der Studie alle Tierbesitzer den Eindruck hatten, dass die Zufütterung einen positiven Einfluss auf den Fellzustand hatte, konnten nach der relativ kurzen Studiendauer von 28 Tagen bei allen acht Hunden auch klinisch Veränderungen am Auge beobachtet werden.

Während die Ergebnisse des Schirmer Tränen Tests und die beobachteten Interferenzbilder an Tag 28 nahezu unverändert blieben (s. Ergebnisteil), konnte bei der Meibometrie ein signifikanter Anstieg der gemessenen Werte um bis zu 143% vermerkt werden. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die LS durch endogene Faktoren, wie die Bereitstellung von bestimmten FS zur Synthese des MS im Gewebe von MD beeinflusst werden kann. Es kann kritisch hinterfragt werden, warum im Gegensatz zur Meibometrie die Interferometrie keine Veränderungen aufzeigte, wo doch ein quantitativer Anstieg von Lipiden am Lidrand auch ein anderes Interferenzbild (vornehmlich das einer dickeren LS) hervorrufen müsste. Jedoch haben die Ergebnisse des Hauptprojektes bereits gezeigt, dass es zwischen dem beobachteten Interferenzbild und dem Angebot an Lipiden (Meibometrie) keinen Zusammenhang gibt. Das wiederum impliziert, dass nicht die Menge des angebotenen MS allein die Stabilität der LS und somit des gesamten TF garantiert. Um diese Annahme zu bestätigen wäre es für weitere, ausgedehntere Studien von großer Wichtigkeit zu überprüfen, ob die hier beobachteten Veränderungen auch an einer größeren Population beobachtet werden können und wenn ja, welche Ergebnisse die Meibometrie und Interferometrie bei Tieren liefern, die tatsächlich einen qualitativen Tränenmangel haben (v.a. reduzierte Meibometrie und Interferenzbilder, die für eine sehr dünne LS sprechen).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann die Interferometrie mittels Tearscope-plus® als ein in der Veterinärmedizin praktikables Instrument zur Beurteilung der LS des TF beim Hund angesehen werden. Das Handling ist sehr einfach zu erlernen und die Untersuchung wird vom Patienten ausnahmslos sehr gut geduldet. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine

Rückschlüsse auf eine mögliche MGD oder eine EDE des Hundes bzw. eine KCS aufgrund eines qualitativen Tränenmangels zu, da die Untersuchungen ausschließlich an gesunden Tieren durchgeführt worden sind. In zukünftigen Studien sollte die Interferometrie unbedingt an Patienten mit Symptomen des „trockenen Auges“ oder einer MGD überprüft werden. Auch eine plakative Darstellung möglicher Interferenzbilder beim Hund (in Form von Postern oder einem Handbuch) sollte angestrebt werden, da beobachtete Bilder und Muster von den am Menschen beobachteten abweichen können. Schließlich ist das Potential der Interferometrie, die Diagnose des evaporativen „trockenen Auges“ zu stellen in der Humanmedizin belegt und sollte auch in der Veterinärmedizin Einzug finden.

Die Meibometrie muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. Zwar ist sie am Hund durchaus durchführbar, es konnten jedoch erhebliche Schwierigkeiten in der Handhabung und in der Interpretation der Messergebnisse aufgezeigt werden. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit stellte der Produzent des Meibometers® (Firma Courage+ Khazaka electronic GmbH) ein neues, weiterentwickeltes Meibometer, das Meibometer ® MB 560 vor [204, 205]. Dieses scheint durch einige relevante Neuerungen vielversprechend und bei weitem nicht so fehleranfällig wie sein Vorgänger. So wird z. B. die Messfolie vorgefertigt geliefert und nach der Probeentnahme in einer photometrischen Messeinheit fixiert, die die Messung mit gleicher Geschwindigkeit aufführt, ohne dass die Schlaufe per Hand mit gleichem Tempo und gleichem Zug bewegt werden muss. Studien zur quantitativen Beurteilung der Lipide am Hundeaugen sollten unbedingt auf das neue Gerät zugreifen und dieses an einer ausreichend großen Population überprüfen. Zudem wären auch bei der Meibometrie Studien an gesunden, aber auch erkrankten Tieren erstrebenswert, denn Unterschiede der Messergebnisse zwischen Gesunden und Kranken könnten bei der Etablierung von Referenzwerten für den Hund hilfreich sein und das Meibometer für die Diagnostik in der Veterinärmedizin interessant machen.

Um mehr über die Komplexität der LS des Hundes zu erfahren, werden weitere Studien zur Biochemie des MS im optimierten Studiendesign notwendig sein (u.a. homogenere, größere Probandenzahl, Untersuchung gesunder und kranker Tiere), mit deren Hilfe weitere Erkenntnisse bezüglich der Physiologie aber auch Pathophysiologie der LS und des TF des Hundes erlangt werden können. Die vorliegenden Daten offenbaren jedoch Möglichkeiten, auf molekularer Ebene mehr über das Krankheitsbild des „trockenen Auges“ beim Hund zu erfahren.

7 Zusammenfassung

Interferometrie, Meibometrie und biochemische Analyse der Lipidschicht des Tränenfilms beim Hund

Alle drei Anteile des präokulären Tränenfilms sind für die Augengesundheit essentiell, denn sie schützen und nähren die Hornhaut und optimieren das Sehvermögen. Die Muzinschicht wird von Becherzellen der Konjunktiva, die wässrige Phase in den Tränendrüsen und die Lipidschicht vornehmlich in den Meibom Drüsen in Form eines öligen Sekretes (Meibom Sekret) gebildet.

Ein hypovolämischer Tränenmangel, der das klassische „trockene Auge“, die Keratokonjunktivitis sicca aufgrund eines quantitativen Mangels der wässrigen Phase hervorrufen kann, wird seit langem in der Veterinärophthalmologie mittels geeigneter Diagnostik erkannt und therapiert. Ein qualitativer Tränenmangel kann ebenfalls aufgrund einer Hyperevaporation der wässrigen Anteile zum „trockenen Auge“ führen und durch eine reduzierte, fehlende, in der Zusammensetzung gestörten Lipidschicht hervorgerufen werden. Diese Form des „trockenen Auges“ ist in der Veterinärmedizin nahezu unbekannt, während sich die Humanmedizin seit Jahrzehnten intensiv mit der Erforschung der Lipidschicht und mit der Diagnostik und Therapie dieser ernstzunehmenden Augenerkrankung beschäftigt. Beim Tier und insbesondere beim Hund mangelt es bis dato sowohl an wissenschaftlich fundierten diagnostischen Methoden zur Untersuchung der Lipidschicht als auch an Informationen bezüglich der Komposition der caninen Lipidschicht. Das evaporative „trockene Auge“ des Hundes bleibt oftmals unerkannt. Um diese Lücke zu schließen, waren die Ziele der vorliegenden Arbeit, das in der Humanmedizin etablierte Verfahren der Interferometrie mittels Tearscope-plus® zur Begutachtung der Lipidschicht an einer großen Hundepopulation hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Auch die Meibometrie mittels Meibometer® MB 550, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Meibom Sekrets sollte erneut an einer großen Probandenzahl überprüft werden. Desweiteren wurde erstmalig das Meibom Sekret des Hundes hinsichtlich seiner biochemischen Zusammensetzung teilweise charakterisiert.

Die Anwendbarkeit der Interferometrie und der Meibometrie konnte am Hund erfolgreich getestet werden. Die Untersuchung wird ausnahmslos gut geduldet und nimmt nur wenige

Sekunden in Anspruch. Bei der Beurteilung der Lipidschicht des Hundes mit dem Tearscope-plus® konnten drei von sechs auch beim Menschen auftretende Interferenzbilder sowie drei weitere Mischbilder beobachtet werden. Bei 98 Hunden (196 Augen) konnten am häufigsten ein homogenes Interferenzbild (35,2%), Wellenmuster (25,5%) und Interferenzfarben (18,9%) beobachtet werden. Diese Muster treten auch beim Menschen auf und sprechen für eine stabile, physiologische Lipidschicht von 40 bis 590 nm Dicke. Die Meibometrie mittels Meibometer® MB 550 wurde bei 56 Tieren durchgeführt (112 Augen) und betrug 299,47 MU (Meibom Units) \pm 170,4 MU. Die hier präsentierten Ergebnisse liegen deutlich über bisherigen Ergebnissen anderer Studien bei Menschen und Hunden. Zwar ließ sich die meibometrische Messung bei allen Probanden durchführen, eine starke Streuung der Ergebnisse sowohl im Tages- als auch im Wochenverlauf schließt die Reproduzierbarkeit dieser Methode derzeit aus. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse des Meibom Sekrets mittels HPLC – MS (Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie) sind vielversprechend. Das Meibom Sekret ähnelt qualitativ stark dem des Menschen, jedoch sind quantitative Unterschiede festgestellt worden. Bei den im caninen MS erstmalig charakterisierten Lipiden handelt es sich um Cholesterol und Cholesterolester, Wachsester, Diacyl- und Triacylglycerine sowie sog. OAHFAs ((O-acyl)-omega- hydroxy- Fettsäuren).

Beruhend auf den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit sollten zukünftige Studien hinsichtlich der Lipidschicht des Tränenfilms nicht nur an gesunden sondern auch an erkrankten Tieren vorgenommen werden, um eine Differenzierung zwischen physiologischen und pathologischen Untersuchungsergebnissen sowohl auf klinisch-diagnostischer als auch auf biochemischer Ebene zu ermöglichen und so die Diagnostik und Therapie des evaporativen „trockenen Auges“ voranzutreiben.

8 Summary

Interferometry, Meibometry and Biochemical Analysis of the Canine Tear Film Lipid Layer

All three parts of the precorneal tear film are essential for eye health. They protect and nourish the cornea and optimize eyesight. The mucin layer is formed by goblet cells, the aqueous layer in the lacrimal glands and the lipid layer is predominantly established in the meibomian glands in the shape of an oily secretion (meibom secretion).

A hypovolemic tear deficiency which can cause “dry eye”, Keratoconjunctivitis sicca, due to a quantitative deficiency of the aqueous layer, has long been able to be recognized and treated in veterinary ophthalmology utilizing suitable diagnostics. A qualitative tear deficiency can also lead to “dry eye” as a result of hyper evaporation of the aqueous parts and is caused by a reduced, lacking, and in its composition impaired lipid layer. While human medicine has engaged in research of the lipid layer as well as diagnostics and therapy of this serious disease for decades, this type of “dry eye” is widely unknown in veterinary medicine. In animals and especially in dogs there is a lack of scientifically reliable diagnostic methods for an examination of the lipid layer as well as information concerning the composition of the canine lipid layer. The evaporative “dry eye” of the dog is often not recognized. In order to close this gap the aim of this study was to verify the procedure of interferometry widely utilized in human medicine using Tearscope-plus® to assess the lipid layer utilizing a large dog population concerning its applicability and reproducibility. Meibometry by means of Meibometer® MB 550, a procedure to quantify the meibom secretion was also to be tested on a larger scope of patients. Furthermore the meibom secretion of the dog was characterized in its biochemical composition for the first time.

Applicability of interferometry and meibometry could be tested on dogs successfully. The examination is admitted well without exception and is carried out within seconds. During the evaluation of the lipid layer of the dog using Tearscope-plus® three of six interference images also seen in humans as well as three additional mixed images were observed. In 98 dogs (196 eyes) a homogenous interference image (35.2%), a wavy pattern (25.5%) and interference colors (18.9%) were observed most commonly. These patterns appear in humans as well and point to a stable, physiological lipid layer of 40 to 590 nm thickness. Meibometry by means of

Meibometer® MB 550 was carried out in 56 animals (112 eyes) and amounted to 299.47 MU (meibom units) \pm 170.4 MU. The results presented here are clearly above existing studies on humans and dogs. Although measuring meibometry could be carried out in all patients, a broad distribution of results over the course of a day as well as a week currently prevents reproducibility of this method. Results of biochemical analysis of the meibom secretion using HPLC – MS (High Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry) are promising. Meibom secretion of the dog is qualitatively very similar to the secretion found in humans, however quantitative differences were found. The lipids found in canine meibom secretion characterized for the first time are cholesterol, cholesterolester, wax ester, diacyl- and triacylglycerols as well as so-called OAHFAs ((O-acyl)-omega-hydroxy-fatty-acids).

Based on the results presented in this study, future studies concerning the lipid layer of the tear film should not only examine healthy but also animals of bad health. This enables a differentiation between physiological and pathological results both on a clinical diagnostic as well as a biochemical level and may lead to improvements of diagnostics and therapy of the evaporative “dry eye”.

9 Literaturverzeichnis

1. Tiffany, J.M., *Physiological Functions of the Meibomian Glands*. Progress in Retinal and Eye Research, 1995. **14**(1): p. 47-74.
2. *Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007)*. Ocul Surf, 2007. **5**(2): p. 179-93.
3. Blackie, C.A., et al., *The relationship between dry eye symptoms and lipid layer thickness*. Cornea, 2009. **28**(7): p. 789-94.
4. Foulks, G.N., *The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease*. Surv Ophthalmol, 2007. **52**(4): p. 369-74.
5. Knop, E., N. Knop, and H. Brewitt, *Das trockene Auge als komplexe Fehlregulation der funktionellen Anatomie der Augenoberfläche*. Ophthalmologie, 2003. **100**(11): p. 917-28.
6. Shine, W.E. and J.P. McCulley, *Keratoconjunctivitis sicca associated with meibomian secretion polar lipid abnormality*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(7): p. 849-52.
7. Bron, A.J., et al., *Functional aspects of the tear film lipid layer*. Exp Eye Res, 2004. **78**(3): p. 347-60.
8. Butovich, I.A., J.C. Wojtowicz, and M. Molai, *Human tear film and meibum. Very long chain wax esters and (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids of meibum*. J Lipid Res, 2009. **50**(12): p. 2471-85.
9. Den, S., et al., *Association between meibomian gland changes and aging, sex, or tear function*. Cornea, 2006. **25**(6): p. 651-5.
10. King-Smith, P.E., et al., *Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up*. Optom Vis Sci, 2008. **85**(8): p. 623-30.
11. Moore, C.P., *Qualitative tear film disease*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1990. **20**(3): p. 565-81.
12. Craig, J.P. and A. Tomlinson, *Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation*. Optom Vis Sci, 1997. **74**(1): p. 8-13.
13. Kaercher, T. and A.J. Bron, *Classification and diagnosis of dry eye*. Dev Ophthalmol, 2008. **41**: p. 36-53.
14. Baron, C. and H.A. Blough, *Composition of the neutral lipids of bovine meibomian secretions*. J Lipid Res, 1976. **17**(4): p. 373-6.
15. Butovich, I.A., *Lipidomic analysis of human meibum using HPLC-MSn*. Methods Mol Biol, 2009. **579**: p. 221-46.
16. Butovich, I.A., et al., *Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of lipids present in human meibomian gland secretions*. Lipids, 2007. **42**(8): p. 765-76.
17. McCulley, J.P. and W. Shine, *A compositional based model for the tear film lipid layer*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1997. **95**: p. 79-88; discussion 88-93.
18. Nichols, K.K., et al., *Identification of fatty acids and fatty acid amides in human meibomian gland secretions*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 34-9.
19. Nicolaidis, N., et al., *Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1981. **20**(4): p. 522-36.
20. Shine, W.E. and J.P. McCulley, *Polar lipids in human meibomian gland secretions*. Curr Eye Res, 2003. **26**(2): p. 89-94.
21. Tiffany, J.M., *Individual variations in human meibomian lipid composition*. Exp Eye Res, 1978. **27**(3): p. 289-300.
22. König, H.E., H.-G. Liebich, and H. Bragulla, *Anatomie der Haussäugetiere. 2. Organe, Kreislauf- und Nervensystem*, ed. Schattauer. Vol. 2. 2002.
23. Goller, T. and K.D. Weyrauch, *[The conjunctival epithelium of dogs. Light and electron microscopic investigations]*. Ann Anat, 1993. **175**(2): p. 127-34.

24. Stades, F.C., et al., *Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt*. 3 ed. 2006: Schlütersche Verlag.
25. Butovich, I.A., *Cholesteryl esters as a depot for very long chain fatty acids in human meibum*. J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 501-13.
26. Niemand, H.G. and S. Arnold-Gloor, *Praktikum der Hundeklinik*. 10 ed. 2006: Georg Thieme Verlag.
27. Gilger, B.C., et al., *Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry*. Am J Vet Res, 1991. **52**(10): p. 1570-2.
28. Gelatt, K.N., *Veterinary Ophthalmology*. 4 ed. Vol. 1. 2007: Blackwell Publishing.
29. Kröger M., M.H., Oliver Stachs, Andrea Meyer-Lindenberg, Ingo Nolte, Rudolf F. Guthoff. *Abstract Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Kornea von Labortieren*. in *107. DOG-Kongress*. 2009. Leipzig.
30. Klintworth, G.K., *The cornea--structure and macromolecules in health and disease. A review*. Am J Pathol, 1977. **89**(3): p. 718-808.
31. Kafarnik, C., J. Fritsche, and S. Reese, *In vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats, dogs and birds*. Vet Ophthalmol, 2007. **10**(4): p. 222-30.
32. Kafarnik, C., J. Fritsche, and S. Reese, *Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal microscopy*. Vet Ophthalmol, 2008. **11**(6): p. 363-7.
33. Matsushashi, K., *[Electron microscopic observation of corneal vascularization. I]*. Rinsho Ganka, 1961. **15**: p. 121-7.
34. Tiffany, J.M., *The normal tear film*. Dev Ophthalmol, 2008. **41**: p. 1-20.
35. Noden, D.M., *Patterning of avian craniofacial muscles*. Dev Biol, 1986. **116**(2): p. 347-56.
36. Carrington, S.D., et al., *Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film. 1. The normal tear film of the dog*. 1987. **28**(7): p. 605-622.
37. Budras, K.-D., et al., *Atlas der Anatomie des Hundes*. 8 ed. 2007: Schlütersche.
38. Walde, I., et al., *Augenheilkunde: Lehrbuch und Atlas Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen*. 3 ed. 2007: Schattauer Verlag.
39. Leonhardt, H., *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8 ed. 1990: Thieme.
40. Moore, C.P., et al., *Density and distribution of canine conjunctival goblet cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1987. **28**(12): p. 1925-32.
41. Meibom, H., *De Vasis Palpebrarum Novis Epistola Helmestadi: Typis & sumptibus*. 1666: Helmstedt.
42. Bron, A.J., L. Benjamin, and G.R. Snibson, *Meibomian gland disease. Classification and grading of lid changes*. Eye, 1991. **5 (Pt 4)**: p. 395-411.
43. Nicolaides, N., et al., *Meibomian gland dysfunction. III. Meibomian gland lipids*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(5): p. 946-51.
44. Kellogg, R., *The history of whales- Their adaption to life in the water*. The Quarterly Review of Biology, 1928. **3**: p. 172-208.
45. Young, N., Dawson, WW., *The ocular secretions of the bottlenose dolphin Tursiops truncatus*. Mar Mammal Sci, 1992. **8**(1).
46. Millar, T.J. and M.L. Pearson, *The effects of dietary and pharmacological manipulation on lipid production in the meibomian and harderian glands of the rabbit*. Adv Exp Med Biol, 2002. **506**(Pt A): p. 431-40.
47. Payne, A.P., *The harderian gland: a tercentennial review*. J Anat, 1994. **185 (Pt 1)**: p. 1-49.
48. Bayón A., A.R., Talavera J, *Avian ophthalmology*. EJCAP, 2007. **17**: p. 253 - 265.
49. Jester, J.V., N. Nicolaides, and R.E. Smith, *Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1981. **20**(4): p. 537-47.

50. Teraishi, T. and M. Yoshioka, *Electron-microscopic and immunohistochemical studies of eyelid reopening in the mouse*. Anat Embryol (Berl), 2001. **204**(2): p. 101-7.
51. Gorgas, K. and A. Volkl, *Peroxisomes in sebaceous glands. IV. Aggregates of tubular peroxisomes in the mouse Meibomian gland*. Histochem J, 1984. **16**(10): p. 1079-98.
52. Olami, Y., et al., *Turnover and migration of meibomian gland cells in rats' eyelids*. Ophthalmic Res, 2001. **33**(3): p. 170-5.
53. Knop, N. and E. Knop, *[Meibomian glands. Part I: anatomy, embryology and histology of the Meibomian glands]*. Ophthalmologe, 2009. **106**(10): p. 872-83.
54. Chew, C.K., et al., *An instrument for quantifying meibomian lipid on the lid margin: the Meibometer*. Curr Eye Res, 1993. **12**(3): p. 247-54.
55. Norn, M., *Meibomian orifices and Marx's line. Studied by triple vital staining*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1985. **63**(6): p. 698-700.
56. Korb, D.R. and C.A. Blackie, *Meibomian gland diagnostic expressibility: correlation with dry eye symptoms and gland location*. Cornea, 2008. **27**(10): p. 1142-7.
57. Hartschuh, W., E. Weihe, and M. Reinecke, *Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence of an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation*. Br J Dermatol, 1983. **109 Suppl 25**: p. 14-7.
58. Luhtala, J., A. Palkama, and H. Uusitalo, *Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(3): p. 640-5.
59. Krenzer, K.L., et al., *Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4874-82.
60. Sullivan, D.A., et al., *Androgen influence on the meibomian gland*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(12): p. 3732-42.
61. Sullivan, D.A., *Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye*. Ocul Surf, 2004. **2**(2): p. 92-123.
62. Wolff, E., *The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of the tear fluid*. Trans Ophthalmol Soc UK, 1946. **66**: p. 291-308.
63. Prydal, J.I. and F.W. Campbell, *Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(6): p. 1996-2005.
64. Mishima, S., *Some Physiological Aspects of the Precorneal Tear Film*. Arch Ophthalmol, 1965. **73**: p. 233-41.
65. Royle, L., et al., *Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences*. Glycoconj J, 2008. **25**(8): p. 763-73.
66. Nichols, B., C.R. Dawson, and B. Togni, *Surface features of the conjunctiva and cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(5): p. 570-6.
67. Argueso, P. and I.K. Gipson, *Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function*. Exp Eye Res, 2001. **73**(3): p. 281-9.
68. Nichols, B.A., M.L. Chiappino, and C.R. Dawson, *Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985. **26**(4): p. 464-73.
69. Saito, A., et al., *The effect of third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs*. Vet Ophthalmol, 2001. **4**(1): p. 13-8.
70. Fischer, F.H. and M. Wiederholt, *Human precorneal tear film pH measured by microelectrodes*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1982. **218**(3): p. 168-70.
71. Ehlers, N., *The Precorneal Film. Biomicroscopical, Histological and Chemical Investigations*. Acta Ophthalmol Suppl, 1965: p. SUPPL 81:1-134.
72. Gelatt, K.N., et al., *Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test*. J Am Vet Med Assoc, 1975. **166**(4): p. 368-70.
73. McClellan, B.H., et al., *Immunoglobulins in tears*. Am J Ophthalmol, 1973. **76**(1): p. 89-101.

74. Wollensak, G., et al., *Effective methods for the investigation of human tear film proteins and lipids*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990. **228**(1): p. 78-82.
75. Green-Church, K.B., et al., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(4): p. 1979-93.
76. Holzfeind, P., et al., *The human lacrimal gland synthesizes apolipoprotein D mRNA in addition to tear prealbumin mRNA, both species encoding members of the lipocalin superfamily*. Exp Eye Res, 1995. **61**(4): p. 495-500.
77. Wojtowicz, J.C., I.A. Butovich, and J.P. McCulley, *Historical brief on composition of human meibum lipids*. Ocul Surf, 2009. **7**(3): p. 145-53.
78. McCulley, J.P., et al., *Impact of evaporation on aqueous tear loss*. Trans Am Ophthalmol Soc, 2006. **104**: p. 121-8.
79. Mishima, S. and D.M. Maurice, *The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface*. Exp Eye Res, 1961. **1**: p. 39-45.
80. Mishima, S. and D.M. Maurice, *The effect of normal evaporation on the eye*. Exp Eye Res, 1961. **1**: p. 46-52.
81. Knop, E., N. Knop, and F. Schirra, *[Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil]*. Ophthalmologe, 2009. **106**(10): p. 884-92.
82. Korb, D.R., et al., *Tear film lipid layer thickness as a function of blinking*. Cornea, 1994. **13**(4): p. 354-9.
83. Foulks, G.N. and A.J. Bron, *Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading*. Ocul Surf, 2003. **1**(3): p. 107-26.
84. Butovich, I.A., T.J. Millar, and B.M. Ham, *Understanding and analyzing meibomian lipids--a review*. Curr Eye Res, 2008. **33**(5): p. 405-20.
85. King-Smith, P.E., E.A. Hinel, and J.J. Nichols, *Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(5): p. 2418-23.
86. King-Smith, P.E., et al., *The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3348-59.
87. Butovich, I., *On the Lipid Composition of Human Meibum and Tears: Comparative Analysis of Nonpolar Lipids*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(9): p. 3779-89.
88. Ham, B.M., R.B. Cole, and J.T. Jacob, *Identification and comparison of the polar phospholipids in normal and dry eye rabbit tears by MALDI-TOF mass spectrometry*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(8): p. 3330-8.
89. Knop, E., et al., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(4): p. 1938-78.
90. Linton, R.G., D.H. Curnow, and W.J. Riley, *The Meibomian Glands: an Investigation into the Secretion and Some Aspects of the Physiology*. Br J Ophthalmol, 1961. **45**(11): p. 718-23.
91. Schirra, F., N. Knop, and E. Knop, *[Dry eye and sex hormones: part 2]*. Ophthalmologe, 2009. **106**(11): p. 965.
92. Schirra, F., et al., *[Sex hormones and dry eye]*. Ophthalmologe, 2009. **106**(11): p. 988-94.
93. Schaumberg, D.A., et al., *Hormone replacement therapy and dry eye syndrome*. Jama, 2001. **286**(17): p. 2114-9.
94. Sullivan, D.A., et al., *Androgen regulation of the meibomian gland*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 327-31.
95. Sullivan, D.A., et al., *Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **966**: p. 211-22.

96. Auw-Haedrich, C. and N. Feltgen, *Estrogen receptor expression in meibomian glands and its correlation with age and dry-eye parameters*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003. **241**(9): p. 705-9.
97. Wickham, L.A., et al., *Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye*. Acta Ophthalmol Scand, 2000. **78**(2): p. 146-53.
98. Thody, A.J. and S. Shuster, *Control and function of sebaceous glands*. Physiol Rev, 1989. **69**(2): p. 383-416.
99. Suzuki, T., et al., *Estrogen and progesterone control of gene expression in the mouse meibomian gland*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(5): p. 1797-808.
100. Seifert, P. and M. Spitznas, *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands*. Exp Eye Res, 1999. **68**(6): p. 685-92.
101. Simons, E. and P.G. Smith, *Sensory and autonomic innervation of the rat eyelid: neuronal origins and peptide phenotypes*. J Chem Neuroanat, 1994. **7**(1-2): p. 35-47.
102. LeDoux, M.S., et al., *Parasympathetic innervation of the meibomian glands in rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(11): p. 2434-41.
103. Craig, J.P. and A. Tomlinson, *Age and gender effects on the normal tear film*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 411-5.
104. Chew, C.K., et al., *The casual level of meibomian lipids in humans*. Curr Eye Res, 1993. **12**(3): p. 255-9.
105. Jester, J.V., S. Rajagopalan, and M. Rodrigues, *Meibomian gland changes in the rhino (hrrhrrh) mouse*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. **29**(7): p. 1190-4.
106. Knop, E., et al., *[Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]*. Ophthalmologie, 2009. **106**(11): p. 966-79.
107. McCulley, J.P. and G.F. Sciallis, *Meibomian keratoconjunctivitis*. Am J Ophthalmol, 1977. **84**(6): p. 788-93.
108. Butovich, I.A., *The Meibomian puzzle: combining pieces together*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(6): p. 483-98.
109. Carrington, S.D., et al., *Keratoconjunctivitis in the dog*. Vet Rec, 1987. **121**(5): p. 115.
110. Klauss, G., et al., *Keratoconjunctivitis sicca associated with administration of etodolac in dogs: 211 cases (1992-2002)*. J Am Vet Med Assoc, 2007. **230**(4): p. 541-7.
111. McCulley, J.P., et al., *Presumed hyposecretory/hyperevaporative KCS: tear characteristics*. Trans Am Ophthalmol Soc, 2003. **101**: p. 141-52; discussion 152-4.
112. Kaswan, R., et al., *Survey of canine tear deficiency in veterinary practice*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 931-9.
113. Williams, D.L., et al., *Reduced tear production in three canine endocrinopathies*. J Small Anim Pract, 2007. **48**(5): p. 252-6.
114. McCulley, J.P. and W.E. Shine, *The lipid layer: the outer surface of the ocular surface tear film*. Biosci Rep, 2001. **21**(4): p. 407-18.
115. Yokoi, N. and A. Komuro, *Non-invasive methods of assessing the tear film*. Exp Eye Res, 2004. **78**(3): p. 399-407.
116. Shimazaki, J., M. Sakata, and K. Tsubota, *Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(10): p. 1266-70.
117. Heiligenhaus, A., et al., *[Therapy of dry eye disorders]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1994. **204**(3): p. 162-8.
118. Schleicher-Przytarski, A., *Lichtmikroskopische Untersuchung des Lidgewebes von Hunden mit Schwerpunkt auf den Meibom Drüsen*. 2009, Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere und Institut für Tierpatologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.
119. Schleicher-Przytarski A., v.d.G.E., Eule C., *Histopathology of the canine meibomian gland*, in *Abstracts: Meeting of the European College of Veterinary Ophthalmologists, European*

- Society of Veterinary Ophthalmology, Versailles, France 14-18 May 2008*, 2009. p. 386-389.
120. Gilbard, J.P., S.R. Rossi, and K.G. Heyda, *Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit*. *Ophthalmology*, 1989. **96**(8): p. 1180-6.
121. Pfeiffer, R.L., *Ophthalmologie bei Kleintieren*. 1991, Stuttgart: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH. 299.
122. Kaercher, T. and H. Brewitt, [*Blepharitis.*]. *Ophthalmologe*, 2004. **101**(11): p. 1135-47; quiz 1148.
123. Nichols, K.K., et al., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(4): p. 1922-9.
124. Mathers, W.D., *Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye*. *Ophthalmology*, 1993. **100**(3): p. 347-51.
125. Goto, E., et al., *Tear evaporation dynamics in normal subjects and subjects with obstructive meibomian gland dysfunction*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(2): p. 533-9.
126. Villani, E., et al., *In Vivo Confocal Microscopy of Meibomian Glands in Sjogren's Syndrome*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010.
127. Yokoi, N., et al., *New instruments for dry eye diagnosis*. *Semin Ophthalmol*, 2005. **20**(2): p. 63-70.
128. Harker, D.B., *A modified Schirmer tear test technique. Its uses in aiding the diagnosis of chronic keratoconjunctivitis sicca (filamentary keratitis) in dogs*. *Vet Rec*, 1970. **86**(7): p. 196-9.
129. Rubin, L.F., R.K. Lynch, and W.S. Stockman, *Clinical estimation of lacrimal function in dogs*. *J Am Vet Med Assoc*, 1965. **147**(9): p. 946-7.
130. Schirmer, O., *Studien zur Physiologie und Pathologie der Tränenabsonderung und Tränenabfuhr*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1903. **56**: p. 197-291.
131. Halberg, G.P. and C. Berens, *Standardized Schirmer tear test kit*. *Am J Ophthalmol*, 1961. **51**: p. 840-2.
132. Knop, E. and N. Knop, [*Meibomian glands : part IV. Functional interactions in the pathogenesis of meibomian gland dysfunction (MGD)*]. *Ophthalmologe*, 2009. **106**(11): p. 980-7.
133. Lim, C.C. and C.L. Cullen, *Schirmer tear test values and tear film break-up times in cats with conjunctivitis*. *Vet Ophthalmol*, 2005. **8**(5): p. 305-10.
134. Lim, C.C., et al., *Effects of feline herpesvirus type 1 on tear film break-up time, Schirmer tear test results, and conjunctival goblet cell density in experimentally infected cats*. *Am J Vet Res*, 2009. **70**(3): p. 394-403.
135. Saito, A. and T. Kotani, *Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles*. *Vet Ophthalmol*, 2001. **4**(1): p. 7-11.
136. Cullen, C.L., C. Lim, and J. Sykes, *Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia*. *Vet Ophthalmol*, 2005. **8**(3): p. 159-65.
137. Prydal, J.I., et al., *Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. **33**(6): p. 2006-11.
138. Guillon, J.-P., *Non-Invasive Tearscope Plus Routine For Contact Lens Fitting*. *Contact Lens and Anterior Eye*, 1998. **21**: p. 31-40.
139. Doane, M.G., *An instrument for in vivo tear film interferometry*. *Optom Vis Sci*, 1989. **66**(6): p. 383-8.
140. Doane, M.G. and M.E. Lee, *Tear film interferometry as a diagnostic tool for evaluating normal and dry-eye tear film*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **438**: p. 297-303.
141. Jahrreiß H., W.N., *Einführung in die Physik*. 5. völlig neu bearb. Aufl. 1993, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.

142. Vogt, A., *Atlas der Spaltlampenmikroskopie des lebenden Auges*. 1921.
143. McDonald, J.E., *Surface phenomena of the tear film*. Am J Ophthalmol, 1969. **67**(1): p. 56-64.
144. Guillon, J.P., *Use of the Tearscope Plus and attachments in the routine examination of the marginal dry eye contact lens patient*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 859-67.
145. King-Smith, P.E., et al., *Interferometric imaging of the full thickness of the precorneal tear film*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2006. **23**(9): p. 2097-104.
146. Goto, E., et al., *Computer-synthesis of an interference color chart of human tear lipid layer, by a colorimetric approach*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(11): p. 4693-7.
147. Keeler, *Tearscope-plus, klinisches Handbuch*. 1997: Keeler.
148. Lydon, D.P. and M. Guillon, *Effect of center thickness variations on the performance of rigid gas permeable contact lenses*. Am J Optom Physiol Opt, 1984. **61**(1): p. 23-7.
149. Mueller, J.K., Wenzel A., Eule C., *Tear Interferometry in healthy dogs and cats*, in *Abstracts: Meeting of the European College of Veterinary Ophthalmologists, European Society of Veterinary Ophthalmology, Versailles, France 14−18 May 2008*, 2009. p. 61-70.
150. Benz, P., A. Tichy, and B. Nell, *Review of the measuring precision of the new Meibometer MB550 through repeated measurements in dogs*. Vet Ophthalmol, 2008. **11**(6): p. 368-74.
151. Ofri, R., et al., *Canine meibometry: establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs*. Vet J, 2007. **174**(3): p. 536-40.
152. Wenzel, A., Mueller J.K., Eule C., *Meibometry: a reliable tool for feline ophthalmology*, in *Abstracts: Meeting of the European College of Veterinary Ophthalmologists, European Society of Veterinary Ophthalmology, Versailles, France 14−18 May 2008*, 2009. p. 61-70.
153. Borchman, D., et al., *Spectroscopic evaluation of human tear lipids*. Chem Phys Lipids, 2007. **147**(2): p. 87-102.
154. Chen, J., K.B. Green-Church, and K.K. Nichols, *Shotgun lipidomic analysis of human meibomian gland secretions with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(12): p. 6220-31.
155. Kolattukudy, P.E., L.M. Rogers, and N. Nicolaidis, *Biosynthesis of lipids by bovine meibomian glands*. Lipids, 1985. **20**(7): p. 468-74.
156. Tiffany, J.M., *The meibomian lipids of the rabbit. I. Overall composition*. Exp Eye Res, 1979. **29**(2): p. 195-202.
157. Guillon, J.P., *Abnormal lipid layers. Observation, differential diagnosis, and classification*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 309-13.
158. Berg J.M., T.J.L., Stryer L., *Biochemie*. 6 ed. 2007, Heidelberg: Elsevier GmbH.
159. Butovich, I.A., E. Uchiyama, and J.P. McCulley, *Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(10): p. 2220-35.
160. Greiner, J.V., et al., *Phospholipids in meibomian gland secretion*. Ophthalmic Res, 1996. **28**(1): p. 44-9.
161. Tiffany, J.M., *The lipid secretion of the meibomian glands*. Adv Lipid Res, 1987. **22**: p. 1-62.
162. Yamada, M., et al., *Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction*. Br J Ophthalmol, 2005. **89**(7): p. 803-5.
163. Glasgow, B.J., et al., *Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands*. Curr Eye Res, 1995. **14**(5): p. 363-72.
164. Glasgow, B.J., et al., *Tear lipocalins: potential lipid scavengers for the corneal surface*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(13): p. 3100-7.
165. Gasymov, O.K., et al., *Tear lipocalin: evidence for a scavenging function to remove lipids from the human corneal surface*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(10): p. 3589-96.

166. Gasyimov, O.K., et al., *Binding studies of tear lipocalin: the role of the conserved tryptophan in maintaining structure, stability and ligand affinity*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1433**(1-2): p. 307-20.
167. King-Smith, P.E., et al., *The contribution of lipid layer movement to tear film thinning and breakup*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(6): p. 2747-56.
168. Geerling, G., et al., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on management and treatment of meibomian gland dysfunction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(4): p. 2050-64.
169. Korb, D.R. and C.A. Blackie, *Meibomian Gland Therapeutic Expression: Quantifying the Applied Pressure and the Limitation of Resulting Pain*. Eye Contact Lens, 2011.
170. Bron, A.J. and J.M. Tiffany, *The meibomian glands and tear film lipids. Structure, function, and control*. Adv Exp Med Biol, 1998. **438**: p. 281-95.
171. Nichols, K.K., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: introduction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(4): p. 1917-21.
172. Eule, J.C., A.M. Borowiak, I.A. Butovich. *Evaluation of Tear Lipid Pattern in Healthy Dogs by HPLC-Mass Spectrometry*. in ARVO 2010 2010. Fort Lauderdale, FL.
173. Yokoi, N., et al., *Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(6): p. 723-9.
174. Williams, D.L., *Analysis of tear uptake by the Schirmer tear test strip in the canine eye*. Vet Ophthalmol, 2005. **8**(5): p. 325-30.
175. Hartley, C., D.L. Williams, and V.J. Adams, *Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs*. Vet Ophthalmol, 2006. **9**(1): p. 53-7.
176. Lawrenson, J.G., R. Birhah, and P.J. Murphy, *Tear-film lipid layer morphology and corneal sensation in the development of blinking in neonates and infants*. J Anat, 2005. **206**(3): p. 265-70.
177. Barnett, K.C. and J. Sansom, *Dry eye in the dog and its treatment*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1985. **104 (Pt 4)**: p. 462-6.
178. Rashid, S., et al., *Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye*. Arch Ophthalmol, 2008. **126**(2): p. 219-25.
179. Miljanovic, B., et al., *Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(4): p. 887-93.
180. Srinivasan, S. and A.R. Slomovic, *Sjogren syndrome*. Compr Ophthalmol Update, 2007. **8**(4): p. 205-12.
181. Barabino, S., et al., *Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component*. Cornea, 2003. **22**(2): p. 97-101.
182. Pinna, A., P. Piccinini, and F. Carta, *Effect of oral linoleic and gamma-linolenic acid on meibomian gland dysfunction*. Cornea, 2007. **26**(3): p. 260-4.
183. Clinipharm/Clinitox and I.f.V.u. -toxikologie. *Clinipharm/Clinitox*. Viacutan® Plus 2011 [cited 24.08.2011]; Available from: http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tpg/00000000/A0163-XX.HTM?inhalt_c.htm.
184. CliniPharm/Clinitox. *CliniPharm/CliniTox Datenbank* 2009 [cited 24.08.2011]; Available from: http://www.vetpharm.uzh.ch/perldocs/index_i.htm.
185. Butovich, I.A., Borowiak A.M., Eule J.C., *Comparative HPLC-MS analysis of canine and human meibomian lipidomes: many similarities, a few differences*. Sci. Rep., 2011. **1**(24).
186. Butovich, I.A., *Fatty acid composition of cholesteryl esters of human meibomian gland secretions*. Steroids, 2010. **75**(10): p. 726-33.
187. Bühl A., Z.P., *SPSS 12 Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows*. Vol. 9. 2005, München, Deutschland: Pearson Education Deutschland GmbH.

188. Guillon, M. and D.P. Lydon, *Tear layer thickness characteristics of rigid gas permeable lenses*. Am J Optom Physiol Opt, 1986. **63**(7): p. 527-35.
189. Butovich, I.A., *On the presence of (O-acyl)-omega-hydroxy fatty acids and of their esters in human meibomian gland secretions*. Invest Ophthalmol Vis Sci. **52**(1): p. 639-41.
190. Balicki, I., K. Radziejewski, and P. Silmanowicz, *Studies on keratoconjunctivitis sicca incidence in crossbred dogs*. Pol J Vet Sci, 2008. **11**(4): p. 353-8.
191. Barnett, K.C. and J. Sansom, *Diagnosis and treatment of keratoconjunctivitis sicca in the dog*. Vet Rec, 1987. **120**(14): p. 340-5.
192. Helper, L., *The tear film in dog. Causes and treatment of diseases associated with overproduction and underproduction of tears*. Anim Eye Res, 1996. **15**: p. 5-11.
193. Eule, J.K.M.A.W.C. *Tear interferometry in healthy dogs and cats*. in *ECVO-Meeting*. 2008. Versailles/France.
194. Nichols, J.J. and P.E. King-Smith, *Thickness of the pre- and post-contact lens tear film measured in vivo by interferometry*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(1): p. 68-77.
195. Norn, M.S., *Semiquantitative interference study of fatty layer of precorneal film*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1979. **57**(5): p. 766-74.
196. Campilho, A., et al., *Color Texture Analysis for Tear Film Classification: A Preliminary Study*, in *Image Analysis and Recognition*. 2010, Springer Berlin / Heidelberg. p. 388-397.
197. Axenfeld Theodor, H.P., *Lehrbuch der Augenheilkunde* Vol. 12. 1992, München: Elsevier
198. Falk, D.S.B., Dieter R.; Stork, David G., *Ein Blick ins Licht: Einblicke in die Natur des Lichts und des Sehens, in Farbe und Fotografie*. 1990, Basel - Boston - Berlin: Berlin-Heidelberg (Springer) 3764322616
199. Bentivoglio, A.R., et al., *Analysis of blink rate patterns in normal subjects*. Mov Disord, 1997. **12**(6): p. 1028-34.
200. Harmer, E.J., Williams D.L. *Blink rate and corneal sensitivity in the dog: preliminary findings*. in *Proceedings of the Annual Meeting of the British Association, European College, European Society and International Society of Veterinary Ophthalmology*. 2003. Cambidge, Great Britain.
201. Sommer, U., et al., *LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures*. J Lipid Res, 2006. **47**(4): p. 804-14.
202. Nicolaidis, N. and E.C. Santos, *The di- and triesters of the lipids of steer and human meibomian glands*. Lipids, 1985. **20**(7): p. 454-67.
203. Aragona, P., et al., *Systemic omega-6 essential fatty acid treatment and pge1 tear content in Sjogren's syndrome patients*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(12): p. 4474-9.
204. COURAGE+KHAZAKA. <http://www.courage-khazaka.de/>. 2001 [cited 05.09.2011].
205. COURAGE+KHAZAKA, *Information und Kurzanleitung für das Meibometer MB 560*. 2011: COURAGE+KHAZAKA

10 Anhang: Tabellen und Grafiken

Tab. 12. 1: Probanden der Reproduzierbarkeits- und Supplementierungsstudie (n=8), (* angegeben in Jahren, ** 2= weiblich kastriert, 3= männlich, 4= männlich kastriert)

Proband	Rasse	Rufname	Alter*	Geschlecht**
1	Zwergpinscher	Tyson	3	4
2	Boxer	Spike	4	3
3	Foxterrier	Strolch	6	4
4	Foxterrier	Pepper	3	4
5	Bodeguero	Geka	2	2
6	Englisch Setter	Lunie	8	2
7	Dackel Mischling	Czarek	10	4
8	Schnauzer Mischling	Vincent	6	4

Tab. 12. 2: Probanden des Hauptprojekts (n=98), (* angegeben in Jahren, ** 1= weiblich, 2= weiblich kastriert, 3= männlich, 4= männlich kastriert)

Proband	Rasse	Alter*	Geschlecht**	Proband	Rasse	Alter*	Geschlecht**
1	Boxer	10	2	38	American Staffordshire Terrie	2	1
2	Collie Mischling	3	1	39	Französische Bulldogge	8	3
3	Berner Sennen Hund	3	3	40	Shar Pei	2	4
4	Labrador Retriever	10	4	41	Mischling	2	4
5	Rhodesian Ridgeback	1	1	42	Rauhaar Dackel	4	4
6	Yorkshire Terrier	8	3	43	Alaskan Malamute	6	3
7	Beagle	10	1	44	Boxer	2	2
8	Husky	4	2	45	Jack Russel Terrier	1	4
9	Schnauzer Mischling	8	2	46	Boxer Mischling	4	3
10	Riesenschnauzer	7	2	47	Deutscher Schäferhund	5	3
11	Dho Khyi	2	1	48	Boxer Mischling	4	1
12	Pudel Mischling	10	1	49	Golden Retriever	7	3
13	Dackel Mischling	7	2	50	Shi Tzu	7	3
14	Königspudel	2	1	51	Jack Russel Mischling	9	2
15	Schäferhund Mischling	10	3	52	Schnauzer Mischling	6	3
16	Terrier Mischling	4	1	53	Königspudel	3	3
17	Belgischer Schäferhund	7	1	54	Jack Russel Terrier	10	4
18	Labrador Retriever	4	1	55	Flat Coated Retriever	3	3
19	Labrador Retriever	3	3	56	Zwergpinscher	3	4
20	Mops	3	4	57	Schäferhund Mischling	4	4
21	Irish Setter	4	3	58	Labrador Retriever	4	1
22	Amerik. Staffordshire Terrier	3	4	59	Dobermann	3	2
23	Schäferhund Mischling	4	1	60	Chin. Schopfhund	5	4
24	Mischling	1	1	61	Cane Corso	3	3
25	Schäferhund Mischling	9	1	62	Kleiner Münsterländer	8	2
26	Deutscher Schäferhund	3	3	63	Americ. Canad. Schäferhund	3	3
27	Parson Jack Russel	1	1	64	Mischling	5	2
28	Weimaraner	1	3	65	Boxer	2	3
29	Boxer	5	3	66	Boxer	4	3
30	Rhodesian Ridgeback	3	1	67	Golden Retriever	3	4
31	Deutscher Schäferhund	1	3	68	Fox Terrier	6	3
32	Border Terrier	3	3	69	Dt. Drahthaar	9	4
33	Riesenschnauzer	3	3	70	Fox Terrier	3	3
34	Jack Russel Terrier	1	1	71	Shi Tzu	9	1
35	Hovawart	8	2	72	Yorkshire Terrier	1	1
36	Rottweiler	1	4	73	Boxer	10	3
37	Beagle	8	4	74	Bull Mastiff	2	1

Fortsetzung :Tab.12. 2:

Proband	Rasse	Alter*	Geschlecht**	Proband	Rasse	Alter*	Geschlecht**
75	Deutscher Schäferhund	1	2	87	Dackel Mischling	10	4
76	Irischer Wolfshund	6	1	88	Afghane	1	1
77	Bodeguero	2	2	89	Irish Setter	8	1
78	Golden Retriever	1	3	90	Boxer	4	2
79	Tibet Terrier	5	2	91	Weimaraner	10	3
80	Englisch Setter	8	2	92	Mops	2	1
81	Französische Bulldogge	1	3	93	Golden Retriever	9	1
82	Yorkshire Terrier	2	2	94	Beagle	1	1
83	Flat Coated Retriever	9	3	95	Labrador Retriever	2	3
84	Mops	7	2	96	Westhighland White Terrier	5	1
85	Mops	2	4	97	Boxer	6	1
86	Westhighland White Terrier	8	1	98	Schnauzer Mischling	6	4

Tab. 12. 3: Auflistung der Probanden, bei welchen MS für die biochemische Analyse entnommen wurde

Rasse	Alter	Geschlecht
Huskey	4	2
Schnauzer-Mischling	7	1
Riesenschnauzer	6	1
Do Khyi	1	3
Pudel-Mischling	9	1
Dackel-Mischling	7	2
Pudel	1	1
Schäferhund-Mischling	9	3
Terrier-Mischling	3	1
Belg. Schäferhund-Mischling	7	1

Tab. 12. 4: Einzelergebnisse der Interferometrie, Meibometrie, des STT I und der Blutwertbestimmung pro Proband (Nr.) und Auge im Hauptprojekt
 ((OD= rechtes Auge; OS= linkes Auge; Int = beobachtetes Interferenzbild (3= Wellenmuster, 4= homogenes Muster, 5= Interferenzfarben, 7= Wellenmuster/ homogenes Muster, 8= homogenes Muster/ Interferenzfarben, 9= Wellenmuster/ Interferenzfarben); MU = gemessene Meibom Units mittels Meibometrie; Chol = Cholesterin (mg/dl); Trigl = Triglyceride (mg/dl); T4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$); fT4 = freies T4 (pmol/l), dieses wurde nur im Verdachtsfall zur Verifizierung einer Euthyreose bestimmt; . = nicht gemessen)

Nr.	Int OD	Int OS	MU OD	MU OS	STT OD	STT OS	Chol	Trigl	T4	fT4
1	7	7	.	.	27	19
2	3	3	.	.	18	20
3	4	4	.	.	24	22
4	7	7	.	.	21	18
5	4	4	.	.	21	22
6	4	4	.	.	16	16
7	4	4	.	.	19	17	260	44	3,1	.
8	7	7	.	.	20	22	169	46	2,4	.
9	4	7	.	.	20	23	179	43	0,2	.
10	4	4	.	.	19	23	343	44	0,1	.
11	4	4	.	.	15	18	171	47	0,3	.
12	7	3	.	.	18	15	189	52	1,2	.
13	3	4	.	.	17	14	221	168	2,2	.
14	4	5	.	.	25	23	185	48	1,2	.
15	3	4	.	.	20	15	187	46	0,6	.
16	9	4	.	.	18	19	195	40	3,3	.
17	4	4	.	.	14	18	289	44	1,4	.
18	3	4	.	.	18	14
19	4	4	.	.	20	18
20	3	3	.	.	24	23
21	4	4	93	469	15	20	178	61	2,9	21,5
22	5	5	89	35	14	12	330	56	3	.
23	8	8	.	.	16	19
24	7	7	527	365	25	30	299	76	3,2	20,2
25	4	4	.	.	20	25
26	3	5	.	.	20	18
27	3	3	.	.	19	20
28	5	5	.	.	19	14
29	4	4	386	1089	22	18	151	51	3,3	.
30	5	5	.	.	23	19
31	8	8	114	123	15	20	169	37	2	.
32	4	4	180	338	28	30	183	31	0,5	0,1
33	7	7	58	94	22	25	214	40	3	17,6

Nr.	Int OD	Int OS	MU OD	MU OS	STT OD	STT OS	Chol	Trigl	T4	ft4
34	5	5	.	.	19	19
35	3	3	82	99	18	21	253	45	2,6	.
36	5	4	133	270	20	17	294	50	2	.
37	4	4	232	299	22	26	251	41	1,9	.
38	8	8	.	.	28	23
39	7	7	.	.	18	18
40	4	4	327	327	25	20	172	74	0,8	0,2
41	4	4	.	.	19	24
42	4	4	83	83	15	15	166	56	2,2	15,9
43	5	5	223	79	15	13	179	33	2,2	.
44	3	3	.	.	20	20
45	3	3	.	.	21	18
46	5	5	150	195	15	12	201	37	2,3	14,7
47	5	5	674	159	15	18	141	40	2,2	.
48	4	4	.	.	20	23
49	4	4	178	199	18	15	280	54	0,1	0,1
50	4	4	239	202	20	18	147	22	1,7	.
51	7	7	.	.	23	20
52	5	5	286	206	17	15	186	69	3,1	19,5
53	7	7	.	.	18	19
54	5	5	346	336	17	20	198	54	3,2	.
55	8	8	.	.	20	22
56	4	4	208	268	22	21
57	3	3	397	596	18	15	301	132	2,1	17,8
58	7	7	598	346	25	24	179	44	1,7	.
59	5	5	.	.	22	18
60	4	4	.	.	19	17
61	4	4	310	261	20	16	222	39	3,5	.
62	4	8	.	.	28	23
63	3	3	428	580	24	20	393	42	2,5	.
64	4	4	.	.	19	18
65	3	3	324	395	35	31	161	24	1,7	.
66	3	3	312	279	24	25
67	5	5	749	548	17	21	183	78	3,7	.
68	3	3	220	133	17	17
69	4	7	251,5	392	19	26	207	62	1,5	12,1
70	9	9	102	179	18	16
71	4	3	221	298	20	18	153	386	1,2	11,1
72	4	4	459	561	17	15	147	97	3	24
73	5	5	.	.	25	27
74	5	5	.	.	14	15
75	4	4	319	442	19	22	260	51	2,3	13

Nr.	Int OD	Int OS	MU OD	MU OS	STT OD	STT OS	Chol	Trigl	T4	ft4
76	9	9	378	492	20	16	176	41	1,1	9,7
77	3	5	230	182	21	21
78	4	4	256	296	25	28	215	63	2,1	.
79	4	4	398	483	18	15	188	93	2,7	.
80	5	3	213	175	18	19
81	5	3	386	417	26	29	164	35	2,9	20,3
82	3	3	223	242	15	18	193	58	4,4	29,5
83	9	9	270	289	19	20	291	78	1,6	9,3
84	3	3	221	325	17	19	224	73	3,4	16,3
85	9	3	336	244	18	21	293	35	3	16,4
86	5	4	355	291	20	20	301	131	4,8	23,8
87	3	3	176	152	23	22
88	9	3	345	317	22	25	214	49	3,3	18,1
89	7	4	293	338	17	15	261	49	3	17,7
90	3	3	495	320	20	24	268	52	2,1	.
91	5	5	336	518	17	15	192	95	2,5	.
92	4	4	147	147	18	21	187	34	2,6	16,8
93	3	3	287	175	24	20	465	64	0,7	6,5
94	3	3	254	837	21	24	154	34	2,5	17,7
95	3	4	159	195	20	22	212	39	1,9	.
96	3	3	268	183	25	25	221	62	4,7	23,7
97	5	5	267	678	30	25	164	48	2,3	14,5
98	3	3	225	183	22	25

Protokollbogen
Lipidschicht des Tränenfilms

Nr.: _____
 Datum: _____

I. Probandengruppe: _____

II. Patientendaten:
 Besitzer: _____ Tiername: _____
 Rasse: _____ Alter: _____
 1) Geschlecht: _____ wenn kastriert, wann _____
 2) Bekannte Erkrankungen: _____
 3) Medikamente: _____
 4) In Narkose: _____
 5) Meibom Sekret entnommen: _____
 6) Lidentnahme: _____
 7) Nüchtern: _____ → erneute U., nüchtern möglich?
 8) Serum: _____ EDTA _____

III. Spaltlampenuntersuchung:

	OD	OS	Bemerkung
Lidstellung			
Distichiasis			
Trichiasis			
Augenausfluß			Menge:
Augenausfluß Art			
Konjunktiva			
Lidrand			
Meibom Drüsen			
Tränenmeniskus			
Hornhaut			

IV. Interferometrie

	OD	OS	Bemerkung
Interferenzbild			
Raster			
Lipidschichtdicke			
BUT			
	○	○	

V. Meniskometrie:

	OD	OS	Bemerkung
Wert			

VI. Meibometrie:

	OD	OS	Bemerkung
Wert			

VII. Schirmer-Tränen-Test I

	OD	OS	Bemerkung
Wert (mm/min)			

VIII. Tear Film Break Up Time (FTBUT)

	OD	OS	Bemerkung
Wert (sec)			

IX. Blutuntersuchung:

	Wert	Referenzwerte
T4		
TSH		
Cholesterin		
Triglyceride		
Glucose		

Abb. 12. 1: Protokollbogen zur Datenerhebung im Hauptprojekt

Legende Protokollbogen	
I. Probandengruppe	Konjunktiva:
1. gesund	1. blassrosa
2. augengesund	2. ggr. gerötet
	3. gerötet
	4. Follikelbildung
II. Patientendaten	Tränenmeniskus:
1) 1. weiblich	1. wenig (vor den Meibomdrüsen)
2. weiblich kastriert	2. im Bereich der Meibomdrüsen
3. männlich	3. viel (außerhalb der Meibomdrüsen)
4. männlich kastriert	
2) 1. keine Erkrankung bekannt	Hornhaut:
2. krank	1. glatt, glänzend, transparent
3) 1. keine Medikamente	2. pigmentiert < 30 %
2. Medikamente	3. pigmentiert > 30%
4) 1. Ja	4. Neovaskularisation
2. Nein	5. Fibrosierung
5) 1. Ja	6. Mineralisation
2. Nein	
6) 1. Ja	IV. Interferometrie:
2. Nein	
7) 1. Ja	Interferenzbild:
2. Nein	1. grobes Maschenwerk
3. erneute Untersuchung nüchtern	2. feines Maschenwerk
möglich	3. wellnartig, fließend
8) 1. Ja	4. homogen
2. Nein	5. Interferenzfarben
	6. körnige Lipidschicht
III. Spaltlampenuntersuchung	Raster:
Lidstellung:	1. gleichmäßig
1. Ohne Auffälligkeiten	2. ungleichmäßig
2. Entropium unten nasal	
3. Entropium unten temporal	
4. Entropium oben	
5. Entropium unten	
6. Makroblepharon	
Distichiasis:	
1. Nein	
2. Ja <5	
3. ja >5	
Trichiasis:	
1. Nein	
2. Ja	
Augenausfluß:	
1. Nein	
2. Ja, Tränenstraße < 1cm	
3. Ja, Tränenstraße > 1cm	
Augenausfluß Art:	
1. serös	
2. sero-mukös	
3. mukös	
4. purulent	

Abb. 12. 2: Legende zum Protokollbogen (s. Abb. 12.1.) des Hauptprojekts

Tab. 12. 5: t-Test für gepaarte Stichproben, zum Beweis, dass zw. OD und OS eines Individuums kein Unterschied besteht für STT I (mittels SPSS 12; Reproduzierbarkeitsstudie)

Statistik bei gepaarten Stichproben

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1 STT OD (mm/Min)	20,53	40	2,873	,454
STT OS (mm/Min)	20,35	40	2,723	,430

Test bei gepaarten Stichproben

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)
	Mittelwert	SD	Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paaren 1 STT OD (mm/Min) STT OS (mm/Min)	0,2	1,9	0,3	-0,4	0,8	,6	39	0,6

Tab. 12. 6: t-Test für gepaarte Stichproben, zum Beweis, dass zw. OD und OS eines Individuum kein Unterschied besteht für Meibometrie (mittels SPSS 12; Reproduzierbarkeitsstudie)

Statistik bei gepaarten Stichproben

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1 Meibometrie OD	208,85	40	53,865	8,517
Meibometrie OS	202,15	40	68,139	10,774

Korrelationen bei gepaarten Stichproben

	N	Korrelation	Signifikanz
Paaren 1 Meibometrie OD & Meibometrie OS	40	,154	,342

Test bei gepaarten Stichproben

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig. (2-seitig)
	Mittelwert	SD	Standardfehler des Mittelwerts	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paaren 1 Meibometrie OD Meibometrie OS	6,7	80,1	12,7	-18,9	32,3	0,5	39	0,6

Tab. 12. 7: Test zum Beweis, dass es keinen Unterschied zw. Interferenzen OD und Interferenzen OS gibt (mittels SPSS 12; Reproduzierbarkeitsstudie)

Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Interferenzen_ OS	Negative Ränge	5(a)	7,30	36,50
Interferenzen_ OD	Positive Ränge	7(b)	5,93	41,50
	Bindungen	28(c)		
	Gesamt	40		

a Interferenzen_OS < Interferenzen_OD

b Interferenzen_OS > Interferenzen_OD

c Interferenzen_OS = Interferenzen_OD

Statistik für Test(b)

	Interferenzen_OS - Interferenzen_OD
Z	-,199(a)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,842

a Basiert auf negativen Rängen, b Wilcoxon-Test

Tab. 12. 8: t-Test für STT I innerhalb der verschiedenen Interferenzmuster:
(exemplarisch für STT I bei Interferenz 3 und 4)

Gruppenstatistiken

	Interferenzbild	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
STT I in mm/min	Wellenmuster	50	21,10	3,94	,56
	homogenes Muster	69	19,68	3,76	,45

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
STT I	Varianzen sind gleich	,00	,96	1,99	117	,049	1,42	,71	,01	2,83
	Varianzen sind ungleich			1,98	102,83	,051	1,42	,72	-,01	2,84

Tab. 12. 9: t-Test für Meibometriegergebnisse innerhalb der verschiedenen Interferenzmuster

Gruppenstatistiken

	Interferenzbild	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Meibometrie	Wellenmuster	21	287,8810	125,00119	27,27750
	homogenes Muster	21	295,5238	138,05637	30,12637

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
	F	Sig. (2-seitig)	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz		
								Untere	Obere	
Meibometrie	Varianzen sind gleich	,098	,755	-,188	40	,852	-7,64286	40,64062	-89,78061	74,49490
				-,188	39,612	,852	-7,64286	40,64062	-89,80570	74,51999

11 Publikationsverzeichnis

Abstract:

Eule, J.C.; Borowiak, A.M.; Butovich, I.A.

Lipidomic analysis of canine meibomian gland secretions

ECVO-Meeting 2010, Berlin, Germany, - S. 352-361

(Abstracts: Meeting of the ECVO, 28-29 May 2010)

Poster

Eule, J.C., A.M. Borowiak, I.A. Butovich (2010)

Evaluation of Tear Lipid Pattern in Healthy Dogs by HPLC-Mass Spectrometry

ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida USA, 02.-06.05.2010

Poster:

A.M. Borowiak, J.C. Eule, I.A. Butovich (2010)

„Interferometrie und biochemische Analyse der Lipidschicht des Tränenfilms beim Hund“

Doktoranden Symposium, Berlin Deutschland, 02. Juli 2010

Journal Article:

Butovich I.A., Borowiak A.M., Eule J.C.

Comparative HPLC-MSⁿ analysis of canine and human meibomian lipidomes: many similarities, a few differences.

Sci. Rep. 1, 24; DOI:10.1038/srep00024 (2011)

12 Danksagungen

In erster Linie gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Corinna Eule für die Überlassung des interessanten Themas, für die nie endende Motivation und Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit, aber auch für die Bereicherung, die weit über das wissenschaftliche Arbeiten hinaus geht.

Prof. Dr. Leo Brunnberg danke ich für die Ermöglichung der Nutzung der Räume und Geräte der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, den „Labordamen“ Frau Carow, Frau Classe und Frau Mittag für ihre kompetente Beratung und die große Hilfsbereitschaft, sowie Peter Potrykus, Godela von Krieger und Nadine Nowack für die paar Minuten zwischen Vorbereitung und OP.

Prof. Dr. Ralf Einspanier danke ich für die Beratung sowie die großzügige Überlassung der Materialien, Geräte und der Arbeitsräume des Instituts für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin. Ebenso möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung bei Christoph Holder und Frau Barbara Kutz-Lohroff bedanken.

Herrn Fabian Lotz vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung für die statistische Beratung und Einsicht, dass Statistik doch eine gewisse Logik hat.

Ganz lieben Dank auch an die Tierärztinnen und Freundinnen Gwendolyna Romkes, Lena Busche, Nisha Joy und Regina Korth für die Hilfe nicht nur im OP.

Dem gesamten Team der Tierarztpraxis Tudies für die jederzeit gewährte Unterstützung in jeder Hinsicht und insbesondere Margarete Tudies, dank der ich weiß, was es heißt, Tierärztin aus Leidenschaft zu sein.

Meinen Eltern Alicja und Grzegorz Borowiak und meiner Schwester Karolina Buhin, die mich stets motiviert, unterstützt und vorangetrieben haben.

Der lustigsten Prüfungsgruppe der Welt und noch immer den besten Freunden der Welt Katja Haase, Daniel Kitzing, Katharina Steininger und Diana Wevers, für ihre Unterstützung, Tipps, die nie endende Motivation, für unvergessliche, lustige, schöne und sehr prägende Momente (und Nächte).

Und meinem Ehemann und besten Freund Julian für all die Hilfe, den Halt, gelegentlich ungemütliche aber doch so notwendige Tritte und die kompromisslose Liebe zu einer ziemlich chaotischen Ehefrau. Nur noch wenige Wochen, dann geht's zur nächsten Etappe. Ich freu mich drauf!

Danke!

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt wurde. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Köln, den 10.10.2011

Anna Maria Ewert geb. Borowiak