

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

Tränenfilmproteine beim Hund

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

vorgelegt von

Sandra Jurk

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2011

Journal-Nr. 3460

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Eule
Zweiter Gutachter: PD Dr. Gabler
Dritter Gutachter: PD Dr. Dr. Grus

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
dogs, tears, eyes, protein, mass spectrometry

Tag der Promotion: 01.03.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-165-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Mutter und Simon

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	9
2.	LITERATURÜBERSICHT	11
2.1	Anatomie und Physiologie der sekretorischen Anteile des Tränenapparates des Hundes	11
2.1.1	Die Tränendrüse	11
2.1.2	Die akzessorische Tränendrüse/ Nickhautdrüse	13
2.1.3	Die Meibom-Drüsen der Augenlider	14
2.1.4	Die Becherzellen der Konjunktiva	15
2.2	Der präkorneale Tränenfilm	17
2.2.1	Das 3-Schicht-Modell	19
2.2.2	Die Muzinschicht	20
2.2.2.1	Membranständige Muzine	22
2.2.2.2	Sekretorische Muzine	22
2.2.3	Die wässrige Schicht	24
2.2.3.1	Lysozym	28
2.2.3.2	Lipocalin	29
2.2.3.3	Lactoferrin	31
2.2.3.4	Albumin	31
2.2.3.5	Immunglobulin A	31
2.2.3.6	Sonstige Bestandteile	34
2.2.4	Die Lipidschicht	37
2.2.4.1	Polare Phase	38
2.2.4.2	Nicht-polare Phase	39

2.3	Klinische Untersuchungsmöglichkeiten des Tränenfilms	39
2.3.1	Standarduntersuchungen für den Tränenfilm	39
2.3.1.1	Schirmer-Tränen-Test	40
2.3.1.2	Phenolrot-Faden-Test	41
2.3.1.3	Tear Film Break Up Time	42
2.3.2	Vitalfärbungen	43
2.3.2.1	Fluoreszein	43
2.3.2.2	Bengalrosa/Lissamingrün	43
2.3.3	Weiterführende Untersuchungen	44
2.3.3.1	Meibometrie	44
2.3.3.2	Osmolarität	45
2.3.3.3	Impressionszytologie	46
2.3.3.4	Tränenproteinanalyse	47
2.4	Immunologie der Augenoberfläche und der sekretorischen Anteile des Tränenapparates	48
2.4.1	Immunmechanismen im Bereich der Tränendrüse	50
2.4.2	Immunmechanismen im Bereich des Tränenfilms	51
2.4.3	Immunmechanismen im Bereich der Kornea	51
2.4.4	Immunmechanismen im Bereich der Konjunktiva	52
2.5	Innervation der Augenoberfläche und der Tränenorgane	55
2.6	Hormoneller Einfluss auf den Tränenapparat	57
2.7	Die Keratokonjunktivitis sicca	60
2.7.1	Klinisches Bild/ Definition des trockenen Auges	60
2.7.2	Pathologie	61
2.7.3	Ätiologie	63

2.7.3.1	Nichtinfektiöse Ursachen	64
2.7.3.2	Infektiöse Ursachen	65
2.7.3.3	Prädisponierte Rassen	66
2.7.4	Therapie	66
2.7.4.1	Konservative Therapie	66
2.7.4.2	Chirurgische Therapie	73
3.	FRAGESTELLUNGEN	74
4.	MATERIAL UND METHODE	75
4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	75
4.2	Gewinnung der Tränenproben	76
4.3	Tiere	77
4.3.1	Klinische Augenuntersuchung	77
4.3.2	Schirmer-Tränen-Test	78
4.3.3	Einteilung der Probanden	78
4.3.4	Elution der Tränenproben	80
4.4	Messung mit dem SELDI ProteinChip	80
4.5	Auswahl einer geeigneten Eluatlösung für die MALDI-Messung	81
4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	82
4.7	Untersuchung der Tränenproben mit dem Massenspektrometer	83
4.7.1	Funktion des Massenspektrometers	83
4.7.2	Auftragen der Proben auf den Probenträger	85
4.7.3	Messung im Linear Modus	86
4.7.4	Messung im Reflektormodus	86
4.8	Aufreinigung der Proben durch Aceton-Fällung	87
4.9	Aufreinigung der Proben mit Dynabeads RCP18	88

4.10	Auswertung der Messungen	88
5.	ERGEBNISSE	90
5.1	Untersuchung der Proben mit dem SELDI Massenspektrometer	90
5.2	Wahl der Elutionslösung	91
5.3	Bestimmung des Proteingehaltes	92
5.4	Messung der Proben mit dem MALDI Massenspektrometer	94
5.4.1	Linear Modus	94
5.4.2	Bearbeitung der Fragestellungen	95
5.4.3	Datenbanksuche	109
6.	DISKUSSION	110
6.1	Diskussion der verwendeten Methoden	110
6.1.1	Proteinbestimmung	110
6.1.2	Auswahl der Elutionslösung	110
6.1.3	SELDI/MALDI	111
6.1.4	Auswertung	112
6.1.5	Datenbanksuche	112
6.2	Diskussion der Ergebnisse	113
6.2.1	SELDI	113
6.2.2	MALDI	113
7.	ZUSAMMENFASSUNG	115
8.	SUMMARY	116
9.	LITERATURVERZEICHNIS	118
10.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	141
11.	TABELLENVERZEICHNIS	142
12.	ANHANG	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µJ	Mikrojoule
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzungen
AC	Adenylatcyclase
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADDE	Hypovolämisches trockenes Auge
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
BUT	Tränenaufließzeit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CAIS	Komplette Androgenresistenz
CALT	Konjunktiva assoziiertes lymphoides Gewebe
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CAN	Acetonitril
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CHCA	Zimtsäure
cm	Zentimeter
CsA	Cyclosporin A
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
dl	Deziliter
EALT	Augen assoziiertes lymphoides Gewebe
EDE	Evaporatives Trockenes Auge
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
evtl.	eventuell
g	Gramm
Gl.	Glandula
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICAM	Interzelluläres Adhäsions Molekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol Triphosphat
k	Kilo
KCS	Keratokonjunktivitis sicca
l	Liter
LDALT	Tränenabfluss- assoziiertes lymphoides Gewebe

LFU	Lakrimale Funktionelle Einheit
LIFT	laser-induced forward transfer
m ²	Quadratmeter
m	männlich
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight
MALT	Mukosa assoziiertes lymphoides Gewebe
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
mk	männlich-kastriert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mN	Millinewton
mmol	Millimol
MMP	Matrix Metalloproteinase
mOsm	Milliosmol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MU	Meibometer Einheiten
MUC	Muzinklassen
NFAT	Transkriptionsfaktor (nuclear factor of activated T-cells)
ng	Nanogramm
NIBUT	nicht-invasiv gemessene Aufreißzeit
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunden
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	Potenz der Hydrogeniumionen
PIP ₂	Phosphatidylinositol Biphosphat
PRT	Phenolrot-Faden-Test
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
SC	sekretorische Komponente
STT	Schirmer-Tränen-Test
SELDI	Surface-enhanced laser desorption/ionization
sog.	so genannt
TCR	Oberflächenrezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TFBUT	Tränenfilm- Aufreißzeit
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor
TL	Tränen-Lipocalin
UTP	Uridintriphosphat
v.a.	vor allem
VIP	Vasointestinales Peptid
w	weiblich
WHWT	West Highland White Terrier
wk	weiblich-kastriert
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Die Transparenz der Hornhaut wird durch ihre Avaskularität, das Fehlen von Pigment und den relativen Dehydratationszustand gewährleistet. Dies hat zur Folge, dass die Kornea hauptsächlich über den präkornealen Tränenfilm ernährt wird. Zusätzlich dient der Tränenfilm als Schutz, indem er Fremdkörper von der Augoberfläche spült. Er stellt die lokale Immunabwehr und hat optische Funktion, indem er Unebenheiten der Hornhautoberfläche ausgleicht. Bei der Keratokonjunktivitis sicca des Hundes handelt es sich um eine fortschreitende entzündliche Reaktion von Kornea und Konjunktiva aufgrund eines unzureichenden präokulären Tränenfilms. Meist wird dies verursacht durch eine mangelhafte oder fehlende Produktion des wässrigen Anteils der Tränenflüssigkeit (Aqueous Tear Deficient Dry Eye). Aber auch Störungen in der Zusammensetzung von Muzin- und Lipidschicht des Tränenfilms führen zu Entzündungsreaktionen im Sinne einer Keratokonjunktivitis sicca (Evaporative Dry Eye). Unbehandelt kommt es im Verlauf der Erkrankung zu kornealen Läsionen mit Ödematisierung, Vaskularisierung und Pigmentierung der Hornhaut, die zur Erblindung führen, sowie zu Hornhautgeschwüren, die aufgrund mangelhafter Wundheilung in einer Perforation und Verlust des Auges enden können. Die Inzidenz dieser Erkrankung in der Hundepopulation wird von KASWAN et al. (1985) mit bis zu 0,4% angegeben, von HELPER (1996) mit 1%. Beim Mensch wird von einer Inzidenz von 1,92% mit steigender Tendenz (ELLWEIN u. URATO, 2002) berichtet, so dass in der Humanmedizin der Tränenfilm als solches und die Ätiologie von Störungen im Tränenfilmaufbau im Interesse der Forschung stehen. Bislang wurde der Tränenfilm klassisch als Drei-Schicht-Modell beschrieben. In der mittleren, wässrigen Schicht befinden sich unter anderem auch zahlreiche tränenspezifische Proteine, die verschiedene essentielle Funktionen für das Auge und den Tränenfilm erfüllen. GRUS et al. (2001) konnten nachweisen, dass sich diese Tränenprotein-Profile beim Sikka-Syndrom des Menschen signifikant verändern und man das trockene Auge bereits, bevor klinische Anzeichen auftreten, anhand der Tränenprotein-Profile erkennen kann.

Nachdem dies vom Mensch bekannt ist, stehen in dieser Arbeit die Tränenproteine des Hundes im Vordergrund. Es folgt zunächst eine Literaturübersicht über den Tränenfilm mit einem Schwerpunkt auf den Tränenproteinen. Weiterhin soll das Vorkommen verschiedener Proteine und Peptide im Tränenfilm des Hundes massenspektrometrisch mit Hilfe von SELDI- und MALDI-TOF untersucht werden.

Die Ursache einer primären KCS beim Hund kann häufig nicht identifiziert werden, eine genetische Prädisposition wird aber vermutet, da bestimmte Rassen überrepräsentiert sind. Der West Highland White Terrier (WHWT) gehört zu den häufig betroffenen Rassen und wurde daher zusätzlich für diese Untersuchung ausgewählt.

Aus diesem Grunde sollten speziell die Tränenprotein-Profile von gesunden WHWT mit einer gesunden Kontrollgruppe von Hunden verschiedener Rassen verglichen werden. Abschließend wurde die Auswirkung der topischen Behandlung mit Immunsuppressiva von caninen KCS-Patienten auf das Tränenproteinprofil untersucht, um zu klären, ob die entstandenen Veränderungen reversibel sind.

2 LITERATURÜBERSICHT

In der Literaturübersicht soll auf die anatomischen und physiologischen Grundlagen des Tränenfilms und die Produktionsstätten der Tränenfilmkomponenten eingegangen werden. Die einzelnen Tränenfilmkomponenten, speziell der wässrigen Anteil, sollen genauer betrachtet werden. Danach folgt eine Übersicht über die bisherigen Kenntnisse über die Keratokonjunktivitis sicca des Hundes. Im Anschluss wird auf die Behandlungsmöglichkeiten und deren Erfolg eingegangen.

2.1 Anatomie und Physiologie der sekretorischen Anteile des Tränenapparates des Hundes

2.1.1 Die Tränendrüse

Die Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*) befindet sich in der Orbita und liegt superotemporal unter dem *Lig. orbitale* dem Bulbus an. Ihre Ausführungsgänge münden temporal in den Konjunktivalsack (WALDE et al., 2008). Sie produziert den wässrigen Anteil des Tränenfilms zu etwa 70% und wird dabei von der Nickhautdrüse (*Gl. palpebrae tertiae superficialis*) unterstützt, die etwa 30% produziert (SAITO et al., 2001). Untersuchungen von CABRAL et al. (2005) zeigten, dass die Tränendrüse beim einzelnen Tier signifikant größer und länger als die Nickhautdrüse ist. Die Tränendrüse und die Nickhautdrüse sind bei männlichen Tieren zudem größer als bei weiblichen (CABRAL et al., 2005). Histologisch weist die *Gl. lacrimalis* keine gut ausgebildete Kapsel auf. Sie zeigt einen läppchenartigen Aufbau mit bindegewebigen Septen. Die Drüsenendstücke (Azini) sind aus zylindrischen, epithelialen Zellen mit basal gelegenen, runden Zellkernen aufgebaut (KASWAN, 1984; CABRAL et al., 2005; MARTIN et al., 1988). Die sekretorischen Epithelzellen umschließen ein zentrales Lumen, in welches die Tränen merokrin sezerniert werden. Der Abfluß der Tränen erfolgt über intra- und interlobuläre Kanäle in die großen Ausführungsgänge. Die Verbindung zwischen den sekretorischen Tubuli und den intralobulären Gängen ist undeutlich, die Gangzellen enthalten stufenweise eine geringere Anzahl von sekretorischen Granula (KASWAN, 1984). Im Gangsystem werden die Zellen mehr kubisch, enthalten aber weiterhin elektronendichte Granula. Sekretorische Granula kommen in geringerer Anzahl auch im distalen Duktussystem vor. Streifenstücke und Sekretrohre wie sie bei den Speicheldrüsen vorkommen, fehlen. Das Ausführungsgangsystem der Tränendrüse ist deutlich weniger differenziert, vermutlich da die Tränen keiner weiteren Veränderung durch Sekretion oder Rückresorption bedürfen. KASWAN (1984) fanden einen sekretorischen Zelltyp in den Tubuli und drei Zelltypen

in den Azini. Auf der Basis von Elektronendichte, Textur und histochemikalischen Befunden, wurden zwei, evtl. drei Typen von Granula klassifiziert. Anhand der enthaltenen Granula wurden die Zelltypen eingeteilt. Die vorherrschenden azinären Zellen besitzen Granula, die mit Hilfe der Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung als Sialomuzin angefärbt werden konnten. Der zweite Typ von azinären Zellen befindet sich in den peripheren Läppchen und enthält lipidhaltige Granula. Beim dritten Typ, der fein granuliert und durchscheinend auftrat, konnte nicht eindeutig festgestellt werden, ob es sich um ein Stadium der Sialomuzin-Granula-Reifung oder um einen Artefakt handelt (KASWAN, 1984). Die azinären Zellen enthalten meist nur einen Typ von Granula. Das tubuläre Epithelium beinhaltet homogene elektronendichte Granula, die sich als neutrale Glykokonjugate anfärben. Sowohl die tubulären als auch die azinären Zellen sind im Besitz von apikalen Mikrovilli, apikalen Verbindungskomplexen, basalen Falten und zellulären Organellen. Die apikalen *tight junctions* repräsentieren die Blut-Tränen-Schranke und spielen eine entscheidende Rolle in der Tränenzusammensetzung (KASWAN, 1984). Die Zellen der Gänge sind kürzer und die Kerne mehr horizontal verlagert, als die von Tubuli und azinären Zellen. Die Oberfläche von azinären, tubulären und dukталen Zellen ist von einer Basalmembran umgeben und nicht komplett umhüllt von myoepithelialen Zellen (KASWAN, 1984). Im Interstitium befindet sich eine Kombination aus Plasmazellen, Lymphozyten, Mastzellen, Endothelialzellen, Fettzellen und Fibroblasten. Lymphozyten, Mastzellen und Nervenendigungen werden im Parenchym gefunden (KASWAN, 1984; CABRAL et al., 2005). Plasmazellen liegen in Gruppen von vier bis fünf Stück oder werden einzeln gefunden. Die Plasmazellen der Tränendrüse sind hauptsächlich vom Immunglobulin A-Typ und verantwortlich für die lokale Produktion von Immunglobulin A. Lymphozyten befinden sich nicht nur im Interstitium, sondern auch in den Wänden von Azini und Gängen. Gewebe-Mastzellen sind zahlreich im Interstitium, basal zwischen den Azini, den Gangzellen oder den myoepithelialen Zellen zu finden. Reichlich vorhanden im interlobulären und interazinären Interstitium sind große Fettzellen. Die Tränendrüse wird als gemischt tubuloazinäre, mukoseröse Drüse beschrieben. SHACKELFORD und KLAPPER (1962) definieren eine Drüse als serös, wenn sie nur neutrale Glykokonjugate und als mukös, wenn sie saure Glykokonjugate enthält. Nach dieser Definition sind die tubulären sekretorischen Zellen hauptsächlich serös und die azinären Endstücke mukös, wobei Sialomuzin das häufigste muköse Sekretionsprodukt ist. Die Tränendrüse und die Nickhautdrüse beim Hund verhalten sich, bis auf die in der Nickhautdrüse vorhandenen lipidhaltigen Azini, gleich in Struktur und Färbeverhalten, so dass die

Beschreibung von KASWAN (1984) auf beide Drüsen zutrifft. CABRAL et al. (2005) fanden in der Tränendrüse einen höheren Anteil an Parenchym. Die Nickhautdrüse zeigte dagegen eine höhere Infiltration an Lymphozyten und mehr interlobuläre Gänge.

2.1.2 Die akzessorische Tränendrüse / Nickhautdrüse

Das dritte Augenlid (*Membrana nictans*) ist eine prominente halbmondförmige Falte der Konjunktiva und befindet sich am medialen Winkel des Auges. Diese Bindehautfalte wird beim Hund von einem hyalinen Knorpel gestützt, dessen Basis über den Grund des Bindehautsacks weit in die Orbita reicht und von der Nickhautdrüse (*Gl. palpebrae tertiae superficialis*) kolbenartig umgeben wird (BARNETT, 1980). Als wichtiger Bestandteil der Nickhaut produziert die Nickhautdrüse etwa 30% des wässrigen Tränenfilms (HELPER, 1970). Die *Glandula membranae nictans* ist durch fibröse Stränge mit dem periokulären Gewebe verbunden (BROOKS, 1991). Das dritte Augenlid hat physiologischerweise eine dorsolaterale Bewegungsrichtung (BARNETT, 1980). Die Protrusion der *Membrana nictans* erfolgt beim Hund durch aktive Retraktion des Augapfels in die Orbita oder sie fällt in Folge der Relaxation der extraokulären Muskulatur im Dämmer Schlaf vor. Der Nickhautvorfall im Schlafzustand verhindert die Austrocknung der Hornhaut. Bei Annäherung an die Hornhaut oder Berührung der Augen Umgebung kommt es neben dem Lidschluß auch zum plötzlichen Nickhautvorfall. Sie dient so als zusätzliches protektives System des Auges (WAGNER u. HEIDER, 1997; WALDE et al., 2008). Die Bewegung der Nickhaut ist beim Hund passiv, da die canine Nickhaut im Gegensatz zur Katze keinerlei Muskulatur enthält (WAGNER u. HEIDER, 1997). Das dritte Augenlid verteilt die Tränen, entfernt Zelldebris und hat signifikante immunologische Funktion. Immunglobulin A-produzierende Plasmazellen befinden sich in hoher Dichte in subepithelialen Räumen im Oberflächenepithelium der Nickhaut sowie im Interstitium der Nickhautdrüse, bevorzugt an der augenzugewandten Fläche (SCHLEGEL et al., 2003). Das beim Hund seromuköse Sekret der Nickhautdrüse entleert sich über mehrere Ausführungsgänge an der fornixnahen Innenfläche der Nickhaut und liefert 30% der Tränenflüssigkeit (SAITO et al., 2001). KASWAN (1984) fanden Zellen in der Nickhautdrüse, die sich mit Oil-Red-O-Färbung positiv auf Lipide anfärben ließen. Die Anwesenheit von lipidhaltigen Zellen ist überraschend. Unter anderem bei Nagetieren ist die Hardersche Drüse bekannt als hauptsächlich lipidproduzierende Drüse. Diese Lipide enthalten auch einen Porphyrinanteil, welches beim Nager verantwortlich für rötliche Tränen ist, wenn das Sekret eintrocknet. Beim Hund wurde ebenfalls ein Zusammenhang vermutet, da Tiere die unter Epiphora leiden deutliche rötlich-braune Tränenstrassen ausbilden (WALDE et al.,

2008). Der Hund besitzt keine separate Hardersche Drüse, aber man könnte annehmen, dass beim Hund die Lipidsekretion von der Nickhautdrüse übernommen wird (KASWAN, 1984). Von der Harderschen Drüse ist ein Geschlechtsdimorphismus bekannt (BREWITT u. ZIERHUT, 2001). Der Hund verfügt in der Ausbuchtung des nasalen Kanthus am Übergang der Bindehaut noch über die rudimentäre Tränenkarunkel (*Caruncula lacrimalis*). Sie ist als modifizierte Hautinsel mit Talg- und Schweißdrüsen ausgestattet und verfügt über akzessorische Tränendrüsen (*Gll. carunculae lacrimalis*) (WALDE et al., 2008).

2.1.3 Die Meibom-Drüsen der Augenlider

Das obere Augenlid (*Palpebra superior*) und das untere Augenlid (*Palpebra inferior*) liegen der Bulbusoberfläche dicht an und begrenzen mit ihrem freien Rand (*Margo palpebrae*) die Lidspalte (*Rima palpebrarum*). Bei den Lidern handelt es sich um bewegliche Hautfalten, die das Auge schützen und durch den regelmäßigen Lidschlag (beim Hund drei bis fünfmal pro Minute) den präokularen Tränenfilm konstant erneuern, verteilen und drainieren. Am Lidrand unterscheidet man eine vordere (*Limbus palpebrae anterior*) und eine hintere (*Limbus palpebrae posterior*) Kante (WALDE et al., 2008). Zwischen diesen beiden Kanten treten nach dem Übergang von verhornendem Plattenepithel ins Bindehautepithel etwa 20 bis 50 keratinisierte Öffnungen der Ausführungsgänge der Meibom-Tarsaldrüsen (*Glandulae tarsales*) auf. Diese holokrinen, modifizierten Talgdrüsen befinden sich unter der Lidbindehaut und sind an der Innenfläche des Lides als etwa vier Millimeter lange, senkrecht zum Lidrand verlaufende weiß-gelbliche Streifen zu erkennen. Durch Kompression entleert sich die Augenbutter (*Sebum palpebra*), ein weißliches, talgiges Sekret. Dieses fettet zusammen mit dem Sekret der Zeis-Drüsen, bei denen es sich um Talgdrüsen handelt, die sich an der Basis der wimpernähnlichen Haare des Oberlids befinden, den Lidrand ein, um so ein Überfließen der Tränenflüssigkeit zu vermeiden (WALDE et al., 2008). Das Sekret der Meibom-Drüsen bildet auch den äußersten Anteil des Tränenfilms, die Lipidschicht und ist essentiell, um eine frühzeitige Verdunstung des Tränenfilms zu vermeiden (OFRI et al., 2007b). Untersuchungen von JESTER et al. (1981) an den Meibom-Drüsen von Menschen, Affen und Kaninchen, zeigten, dass es sich um einfach verzweigte Drüsen handelt. Jede Meibom-Drüse enthält einen einzelnen zentralen Gang. Das Gangepithelium besteht aus einer Basalzellschicht, einer Intermediär-Zellschicht und einer Schicht aus verhornten Zellen. Die Basalschicht besteht aus einer einschichtigen Lage kubischer Zellen, die einer Basallamina aus feinem fibrillärem Material aufliegt (JESTER et al., 1981). Über der Basalschicht befinden sich ein bis zwei Lagen aus eckigen Intermediärzellen. Übergangsformen zwischen Basalzellen und

Intermediärzellen wurden ebenfalls gefunden. Die Intermediärzellen beinhalten membrangebundene elektronendichte Granula, diese lamellenförmig angeordnet. Solche Granula wurden bislang nur bei der keratinisierten Epidermis beschrieben. Der Übergang zwischen Gangepithelium und Drüsenzellen (Meibozyten) erfolgt abrupt durch einen Wechsel von keratinisierten Zellen zu Meibozyten. Übergangselemente konnten nicht identifiziert werden (JESTER et al., 1981). Das umgebende Gewebe enthält dichtes Kollagen, Fibroblasten und Kapillaren. Verbindungen zwischen Nervenzellen und Epithel- oder Drüsenzellen konnten nicht gefunden werden. Bei den Drüsenzellen waren drei Typen erkennbar. Basalzellen mit feingranuliertem, elektronendichtem Zytoplasma und zahlreichen Ribosomen, Mitochondrien und Tonofilamenten. Desmosomen verankern sie in der Basallamina (JESTER et al., 1981). Darüber befinden sich differenzierte Zellen mit gut entwickeltem, glattem endoplasmatischem Retikulum und zahlreichen Meibomvesikeln in zunehmender Größe, je nach Reifegrad der Zelle. Im Zentrum des Azinus, angrenzend zum Lumen, wurden degenerierte Zellen gefunden. Diese enthalten große Meibomvesikel, umgeben von fein granuliertem, elektronendichtem Zytoplasma. Im Lumen des Ganges konnten Fragmente dieser Zellen gefunden werden (JESTER et al., 1981). OFRI et al. (2007b) stellten Untersuchungen zur Messung der Menge des Meibom-Sekretes an. Mit Hilfe des Meibometers konnten mittlere Meibomium Mengen von 179 ± 60 Meibometer-Einheiten beim Hund festgestellt werden. Ein Einfluß durch Alter, Geschlecht oder untersuchte Seite konnte nicht festgestellt werden. Allerdings scheint es rassenspezifische Unterschiede zu geben. Der Minischнауzer zeigte in dieser Untersuchung signifikant niedrigere Werte (OFRI et al., 2007b). HYKIN u. BRON (1992) fanden auch beim Menschen keine altersabhängigen Veränderungen in der Form der Gänge oder der Meibom-Drüsen. Allerdings ließ sich das Sekret bei älteren Menschen schwerer entleeren.

2.1.4 Die Becherzellen der Konjunktiva

Die *Tunica conjunctiva* entspringt an der Innenkante der Lider und bedeckt als Lidbindehaut (*Conjunctiva palpebrae*) die Innenfläche der Lider. An der Basis des Bindehautsacks geht sie als gut verschiebliche Augen- oder Augapfelbindehaut (*Conjunctiva bulbi*) auf den Augapfel über und inseriert am Korneaskleralfalz (*Limbus corneae*) (WALDE et al., 2008). Beim Mensch enthält die Limbusregion des Konjunktivaepithels Zellen mit auffallend vielen Mitochondrien. Sekretorische Zellen sind im Limbusbereich dagegen nicht zu finden (STEUHL, 2001). Die mitochondrienreichen Epithelzellen weisen auf aktive zelluläre Transportprozesse in dieser Region hin. Ausserdem lassen sich Adenosintriphosphatase und Karboanhydrase nachweisen. Diese Befunde deuten daraufhin, dass das Limbusepithel

aktive, energiefordernde Transportprozesse unterstützt, die entweder der Dehydrierung oder der Ernährung dienen (STEUHL, 2001). Das Limbusepithel wird als wichtiges Reservoir für das Epithel der Hornhautoberfläche angesehen. Die Zellen erneuern sich selbst durch Mitose, wobei eine der Tochterzellen proliferiert und sich zur kornealen Epithelzelle differenziert. Man vermutet, dass die Differenzierung von Stammzellen zu Teilungszellen durch Serumfaktoren wie z.B. Retinolsäure stimuliert wird. Die Multiplikation der Teilungszellen wird durch zahlreiche Wachstumsfaktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem Fibroblasten Wachstumsfaktor, dem Nervenwachstumsfaktor und durch hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration unterstützt (STEUHL, 2001). Am *Limbus corneae* enden die bindegewebigen und vaskulären Strukturen der Konjunktiva, nicht aber ihr unverhorntes, mehrschichtiges, hochprismatisches Epithel, welches sich nun als unverhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel auf der Korneaoberfläche fortsetzt. Etwa zwei bis drei Millimeter hinter dem Limbus ist die Augenbindehaut mit der Tenon-Kapsel verbunden, was zur vorderen Aufhängung des Augapfels beiträgt und die Augenbindehaut daran hindert, über die Hornhaut zu rutschen (WALDE et al., 2008). Die Bindehaut besteht aus dem Epithel und der Eigenschicht (*Lamina propria*). Beim Mensch sind fünf Typen von polygonalen Zellen anhand ihrer Organellen und der Struktur des Zytoplasmas beschrieben. (Typ I: Becherzellen, Typ II: Zellen mit sekretorischer Granula, Typ III: Zellen reich an Golgi-Komplexen, Typ IV: Zellen mit viel rauem ER, Typ V: Zellen mit hoher Anzahl an Mitochondrien). Am häufigsten finden sich beim Mensch Typ IV- und Typ V-Zellen (STEUHL, 2001). Neben der sekretorischen Eigenschaft besitzt die Konjunktiva auch erhebliche resorptive Fähigkeiten. Darauf deuten morphologische Charakteristika, wie die zahlreichen subepithelialen Kapillaren, die ein stark gefenstertes Endothel aufweisen, sowie die zahlreichen Mikrovilli und die Mikroplicae auf der epithelialen Oberfläche, welche die resorptive Fläche stark vergrößern (STEUHL, 2001). Das Bindehautepithel enthält schleimproduzierende Becherzellen, die im unteren nasalen und mittleren Fornix sowie in der unteren Lidbindehaut besonders zahlreich vorhanden sind, in der *Conjunctiva bulbi* aber fehlen. Diese Becherzellen produzieren das gelförmige ungelöste Muzin, welches die innerste Schicht des Tränenfilms bildet und der Kornea direkt anliegt (HICKS et al., 1998; MOORE et al., 1987). Bei den caninen Becherzellen besteht eine inhomogene Verteilung innerhalb der Konjunktiva. Becherzellen in hoher Anzahl befinden sich am unteren nasalen Fornix und dem angrenzenden Gewebe, im unteren mittleren Fornix und im unteren nasalen Tarsalbereich (MOORE et al., 1987). In weiter unten oder oberhalb gelegenen Gebieten der Konjunktiva und der perilimbalen

Augenoberfläche fehlen sie dagegen. Die Becherzellen sind im histologischen Präparat anhand ihres, in der Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung positiven Zellmaterials, zu erkennen. Um die normale Anzahl der Becherzellen zu ermitteln, erstellten MOORE et al. (1987) einen Becherzell-Index. Dafür wurden 500 Epithelzellen ausgezählt und in das Verhältnis zu den vorhandenen Becherzellen gesetzt. In den Bereichen mit der größten Becherzellendichte lag er bei 0,299. Es ist wenig bekannt über Faktoren, welche die normale konjunktivale Dichte und die Verteilung der Becherzellen beeinflussen, aber die konjunktivale Hydratation scheint einer der signifikanten Faktoren zu sein. MOORE et al. (1987) gehen davon aus, dass es infolge der Schwerkraft zu einer Ansammlung der wässrigen Tränen im unteren Konjunktivalsack kommt. Durch die Bildung des Tränensees im medialen Kanthus kommt es zu einer maximalen Befeuchtung des unteren nasalen Fornix, dem unteren Augenlid und der Nickhaut. Somit sehen sie einen direkten Zusammenhang zwischen dem Grad der Befeuchtung und der Zahl der konjunktivalen Becherzellen. Diese These wird dadurch gestützt, dass bei humanen Sikka-Patienten eine signifikant geringere Anzahl an Becherzellen gefunden wird. Zudem ist belegt, dass eine hohe Menge an Tränenflüssigkeit essentiell für die Becherzell-Gesundheit ist, die sekretorischen Zellen stimuliert und die Differenzierung von Bindehautepithelzellen fördert (GEERLING u. HARTWIG, 2002). Die Verteilung der Becherzellen beim Hund ist mit der des Menschen vergleichbar, somit scheint der Hund als Modell für das konjunktivale Muzinsystem geeignet (MOORE et al., 1987). Die *Lamina propria* besteht aus der unter dem Epithel liegenden Drüsenschicht und der tiefen Bindegewebsschicht. In der Drüsenschicht befinden sich viele Lymphozyten, die bei Antigenexposition aktive Follikel besonders an der Innenfläche des dritten Augenlides und in den Fornices bilden können. In der Bindegewebsschicht, die an den Müller-Muskel grenzt, befinden sich Nerven, Blut- und Lymphgefäße sowie akzessorische Tränendrüsen (*Krause-Drüsen*). Die konjunktivalen und palpebralen Lymphgefäße, die an den Kommissuren zusammentreffen, sind der einzige Lymphabfluss der Augenadnexe (WALDE et al., 2008).

2.2 Der präkorneale Tränenfilm

Der präkorneale Tränenfilm ist essentiell für die Gesundheit, die Transparenz und die optische Qualität der Augenoberfläche (HICKS et al., 1997). Die Hauptfunktionen des Tränenfilms sind die Aufrechterhaltung der glatten Oberfläche für eine optimale Lichtbrechung, das Befeuchten von Kornea und Konjunktiva, die Versorgung der Kornea mit Nährstoffen (unter anderem

Glukose) und Sauerstoff sowie der Abtransport von metabolischen Nebenprodukten. Der Tränenfilm befördert weiße Blutzellen zu Kornea und Konjunktiva, entfernt Fremdmaterial und schützt durch spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen die Augenoberfläche vor Pathogenen (DAVIDSON u. KUONEN, 2004). ROBERTS u. ERICKSON (1962) konnten beim gesunden Hund einen mittleren Tränenfluss von 10,5µl/Min messen. Bei den Tränen handelt es sich um eine klare, leicht alkalische Lösung mit einem mittleren pH-Wert von 7,5 (MAGRANE u. DORR, 1973). Der physiologische pH-Bereich liegt beim Mensch zwischen 7,2 und 7,4. Durch die Kohlenstoffdioxid-Verluste bei geöffneten Lidern wird der pH jedoch schnell in den alkalischen Bereich (pH 8) verschoben. Der Tränenfilm verfügt über drei Puffersysteme, die über Kohlensäure-Hydrogencarbonat, amphotere Proteine und Phosphat wirken, um Verschiebungen des pH-Wertes wieder zu korrigieren. Beim Mensch wird ein pH-Wert von 7 bis 9 als normaler Toleranzbereich angesehen (KNOP u. KNOP, 2003). Die Elektrolytkonzentration von Tränen und Serum ist bei Mensch, Rind und Kaninchen vergleichbar. Nur Kalium hat in den Tränen eine bis zu sechsfach höhere Konzentration, was auf einen aktiven Transportmechanismus hinweist (MIRCHEFF, 1989). Die wässrige Schicht besteht zu 98,2% aus Wasser und zu 1,8% aus weiteren Bestandteilen, wie Proteinen, Glykoproteinen, Elektrolyten, Glukose, Urea und oberflächenaktive Polymeren (MIRCHEFF, 1989). Muzine scheinen wie ein Netzwerk in der wässrigen Schicht verteilt zu sein und NICHOLS et al. (1985) beschreibt die Muzinschicht als eng verbunden mit den kornealen Mikrovilli und zusätzlich mit der Glykokalyx in der Konjunktiva verankert. Der Tränenfilm wird von einer dünnen Lipidschicht bedeckt. Polare Lipide wie die Phospholipide befinden sich an der Wasser-Muzin-Grenze und nicht-polare Lipide wie Cholesterol an der Grenzfläche der Tränenflüssigkeit zur Luft. Die Stabilität des Tränenfilms hängt von der Lidschlagfrequenz, der kornealen Oberflächenstruktur, der Komposition der verschiedenen Schichten und den Konzentrationen der anderen Tränenfilmkomponenten ab (BRON, 1994). Das normale Tränenvolumen beträgt bei Hund und Katze ca. 7µl (SPIESS, 1998) und der Tränenfilm ist beim Hund etwa 0,04-0,07mm dick (STADES et al., 2006). Die Oberflächenspannung von humanen Tränen wurde von TIFFANY et al. (1989) gemessen und betrug $43,6 \pm 2,7$ mN/m. Die normale Tränenfilmsekretion beim Mensch wird mit 1 bis 2µl pro Minute angegeben (MISHIMA, 1965). RUBIN et al. (1965) geben einen durchschnittlichen Tränenfluß beim Hund von 10,5µl pro Minute an.

2.2.1 Das 3-Schicht-Modell

Klassisch wurde der Tränenfilm als etwa $7\mu\text{m}$ dick und aus drei Schichten bestehend beschrieben (PRYDAL et al., 1992; HICKS et al., 1997). Einer äußeren Lipidschicht, produziert von den Meibom-Drüsen, einer mittleren wässrigen Schicht, die etwa 90% der Dicke ausmacht, von den Tränendrüse produziert und einer inneren muzin-enthaltenden Gelschicht, etwa $1\mu\text{m}$ dick, gebildet von den Becherzellen (HOLLY, 1973; MOORE u. TIFFANY, 1979). Durch die Arbeit zahlreicher Forscher auf diesem Gebiet, wandelt sich diese Vorstellung der wasserdominierten drei Schichten in ein dreidimensionales, muzindominiertes Gel (PRYDAL et al., 1992), welches von der wässrigen Schicht hydriert wird und Elektrolyte, organische Verbindungen sowie zahlreiche Proteine enthält und etwa $40\mu\text{m}$ dick ist. Mittlerweile wird zunehmend auch von einer funktionalen Einheit gesprochen (ROLANDO u. ZIERHUT, 2001). Diese wird gebildet aus dem Epithelium von Konjunktiva, Kornea und Limbus zusammen mit den Augenlidern, den Tränendrüsen und dem Tränenfilm. KING-SMITH et al. (2000) schätzen die Dicke des humanen Tränenfilms anhand ihrer Untersuchungen auf $3\mu\text{m}$. MIANO et al. (2005) konnten zeigen, dass die Tränenproteine und dabei besonders Lipocalin in die Erhaltung der Lipidschicht involviert sind, da der Tränenfilm ein ungewöhnlich großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis aufweist. Beim Mensch beträgt die Oberfläche etwa 2cm^2 bei einer Tränenfilmdicke von $7\text{-}10\mu\text{m}$.

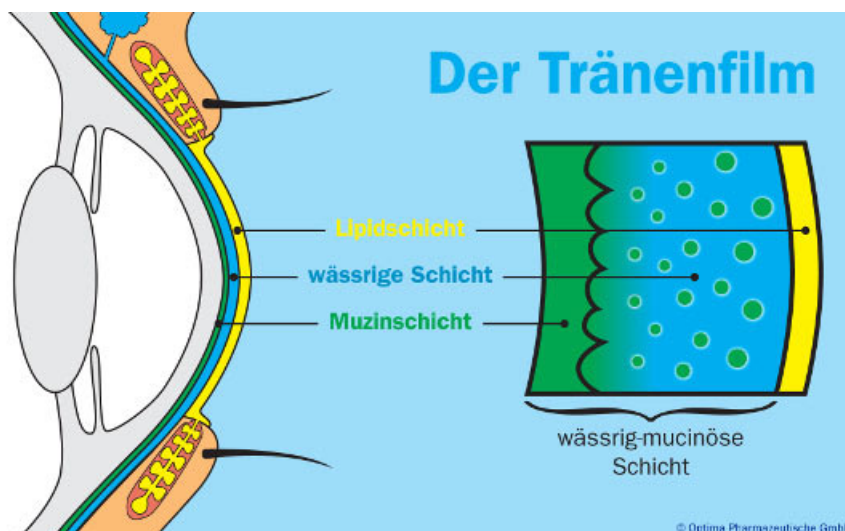


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Tränenfilms (Quelle: Optima Pharmazeutische GmbH, 2012)

2.2.2 Die Muzinschicht

Das korneale und konjunktivale Epithel ist mit zahlreichen Mikrovilli versehen, welche wiederum mit einer Glykokalyx, die aus transmembranen Muzinen (MUC1, MUC4, MUC16) gebildet wird, bedeckt ist (GIPSON, 2003; ARGÜESO u. GIPSON, 2001). Diese Glykokalyx kann sich verzweigen und Längen von 300nm erreichen (GIPSON, 2003). Jedes Filament ist an der Zellmembran verankert. Die Muzinschicht ist an der Glykokalyx angeheftet und schützt so das Epithel vor den Scherkräften, die beim Lidschlag entstehen. Auch kann sich der wässrige Tränenanteil durch die hydrophile Muzinschicht gleichmäßig über dem hydrophoben Korneaepithel verteilen (GIPSON, 2003). Muzine sind essentiell für die Stabilität und die Verteilung des Tränenfilms. Indem sie mit den darüber liegenden Lipiden interagieren, reduzieren sie die Oberflächenspannung des Tränenfilms (CARRINGTON et al., 1993). Die rheologischen Eigenschaften des Tränenfilms beruhen vermutlich hauptsächlich auf den Muzinen. Lösungen von Muzinen zeigen ein Non-Newton Verhalten (HAMANO u. MITSUNAGA, 1973; TIFFANY et al., 1989; HOLLY u. HOLLY 1994). Die Muzinschicht verhindert die Anlagerung von Bakterien, indem sie diese bindet, einhüllt und den ableitenden Tränenwegen zuführt. Ebenso werden Zelldebris und Fremdkörper von der Augenoberfläche entfernt (LEMP u. BLACKMAN, 1981). Muzine sind hydrophile Glykoproteine, bestehend aus einer zentralen Proteinkette und langen Seitenketten aus Polysacchariden. Die Polysaccharide verleihen den Muzinen eine hohe Wasserbindungskapazität und schützen das zentrale Protein vor enzymatischem Abbau (HICKS et al., 1995). Muzine bestehen zu 50-80% aus Polysacchariden, welche eine sehr hohe molekulare Masse besitzen und durch Sialyl- oder Sulfatgruppen eine starke negative Ladung tragen. Dieser anionische Charakter, sowie die Hydroxylgruppen innerhalb der Polysaccharide ermöglichen es den Muzinen viel Wasser an sich zu binden. Die Oligosaccharid-Seitenketten enthalten ein charakteristisches Muster von Monosacchariden, reich an Galactose, Fucose, N-Acetylhexosaminen, N-Acetylneuraminsäure (CARLSTEDT et al., 1995) und einem kleinen Anteil von Mannose und Glukose (CHAO et al., 1988). Das zentrale Protein ist reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin. Es enthält bei allen bisher bekannten Muzinen mehrere *tandem repeat* Domänen. An diesen Bereichen sind die Polysaccharide durch Glykolisierung an das Protein gebunden (GENDLER u. SPICER, 1995; ARGÜESE u. GIPSON, 2001). Die *tandem repeat* Domänen unterscheiden die „echten“ Muzine von muzinähnlichen Glykoproteinen wie GlyCAM1 oder MadCAM1, die bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen. Die Enden der Polysaccharide sind teilweise mit Sulfatgruppen oder acetylierten Sialinsäuregruppen versehen, um einen Abbau der

Muzine durch Bakterien oder Proteasen zu erschweren (NIEUW-AMERONGEN et al., 1995). Die einzelnen Muzine sind vermutlich über Disulfidbrücken miteinander verknüpft, wodurch sich das Auftreten linearer Muzinketten mit etwa der zwanzigfachen Masse eines einzelnen Muzins erklären lässt (HICKS et al., 1995). Beim Mensch werden auch in den ableitenden Tränenwegen zahlreiche Muzine produziert, die zum Teil mit denen von Konjunktiva und Tränendrüse vergleichbar sind. Sie könnten dem Abtransport und der antimikrobiellen Abwehr dienen (PAULSEN et al., 2003). Die Freisetzung der Muzine muss streng geregelt sein, da sowohl eine Über- als auch eine Unterproduktion zu Störungen an der Augenoberfläche führen. Die Muzinproduktion kann durch die Synthese, die Freisetzung und die Proliferation der muzinproduzierenden Zellen reguliert werden (DARTT, 2004). Muzin wird produziert von den Becherzellen der Konjunktiva, den Epithelzellen von Konjunktiva und Kornea und auch der Tränendrüse (CARRAWAY et al., 2000). Die Becherzellen setzen das Muzin nach einem Stimulus durch apokrine Sekretion frei (SPECIAN u. NEUTRA, 1980). Parasympathische Nerven und ihre Neurotransmitter scheinen der hauptsächlichste neurale Stimulus für die Becherzellsekretion zu sein (DARTT, 2004). Ein anderer potenter Stimulus ist die Sekretion von purinergen Agonisten, wie Uridintriphosphat und Adenosintriphosphat (JUMBLATT et al., 1995). Auch die zahlreich im Tränenfilm gefundenen Wachstumsfaktoren könnten eine Rolle in der Aktivierung der Becherzellen spielen, die Rezeptoren dafür wurden auf den Becherzellen nachgewiesen (SHATOS et al., 2003). Auch scheinen die Wachstumsfaktoren die Proliferation der Becherzellen selbst zu stimulieren (DARTT, 2004). Der Mechanismus der Muzinsekretion durch die kornealen und konjunktivalen Epithelzellen ist noch nicht geklärt. ARGÜESE u. GIPSON (2001) vermuten, dass auch andere Faktoren wie Luftverschmutzung, bakterielle Infektionen oder hormonelle Veränderungen einen Einfluss auf die Muzinproduktion haben. Für CHANDLER u. GILLETTE (1983) stellt auch der Lidschlag einen mechanischen Reiz, der die Muzinproduktion anregt, dar. Ebenso wirken sich die Osmolarität des Tränenfilms und die allgemeine Intaktheit der Becherzellen im konjunktivalen Gewebe aus (HUANG et al., 1989). Ratte und Maus weisen hohe Gehalte von rMUC4 in der Kornea auf. Beim Mensch dagegen findet sich nur eine geringe oder fehlende korneale MUC4 Expression. Durch die hohe Expressionsrate im apikalen Bereich des Hornhautepithels der Ratte wird vermutet, dass MUC4 bei der Stabilisierung des Tränenfilms eine Rolle spielt. Dies könnte auch die niedrige Lidschlagfrequenz von Nagern im Vergleich zum Mensch erklären (TEI et al., 1999). TEI et al. (2000) zeigten auch, dass ein Mangel an Vitamin A die Expression von rMuc4 und rMuc5Ac reduziert und zu einem schuppigen Epithel führt.

Rezeptoren für Ascorbinsäure sind in den regulatorischen Bereichen der Muzingene vorhanden.

Die Muzine werden in zwei Gruppen eingeteilt: die membranständigen und die sekretorischen Muzine. Unabhängig davon werden sie entsprechend der Klassifikation des Human Gene Mapping Committees mit dem Kürzel „MUC“, gefolgt von einer Zahl in der Reihenfolge ihrer Entdeckung in MUC 1–20 unterteilt. MUC5AC (GIPSON, 2003) und MUC4 (JUMBLATT et al., 1995) sind die häufigsten Muzine beim Mensch.

2.2.2.1 Membranständige Muzine

Zu den membranständigen Muzinen gehören MUC1, 3A, 3B, 4, 12, 13, 15, 16, 17 und 20. Alle membrangebundenen Muzine besitzen einen hydrophoben Bereich, der in der Membran inseriert und das Muzin an der Oberfläche der apikalen Zellen verankert, ein kurzes zytoplasmatisches Ende, welches bis ins Zytoplasma ragt und einen extrazellulären Anteil, der in den Tränenfilm reicht (ARGÜESO u. GIPSON, 2001). Zusätzlich besitzen sechs dieser Muzine (MUC 3A, 3B, 4, 12, 13 und 17) Wachstumsfaktor-ähnliche Bereiche. Man vermutet, dass sie dadurch in die Regulation des Epithelzell-Wachstum involviert sind (WILLIAMS et al., 200; CARRAWAY et al., 2000). Die membranständigen Muzine formen eine dichte Barriere in der Glykokalyx. Diese schützt das Auge vor Pathogenen und dient den Lidern als gleitende Oberfläche. Die sekretorischen Muzine können sich leicht zwischen den membranassoziierten Muzinen bewegen, da sie sich durch ihren anionischen Charakter gegenseitig abstoßen (GIPSON, 2003). Viele der membranassoziierten Muzine lösen sich von der Epitheloberfläche und befinden sich in löslicher Form im extrazellulären Fluid (MONIAUX et al., 2001). Obwohl es sich bei MUC1 und MUC4 um membranständige Muzine handelt, können sie auch frei im Tränenfilm des Menschen nachgewiesen werden (JUMBLATT et al., 2003).

2.2.2.2 Sekretorische Muzine

Zu den sekretorischen Muzinen gehören MUC2, 5AC, 5B, 6, 7, 9 und 19. Basierend auf ihrer Fähigkeit Polymere zu bilden, können zwei Typen von sekretorischen Muzinen unterschieden werden, kleine lösliche (MUC7 und MUC9) und sehr große, gelformende Muzine (MUC2, 5AC, 5B und 6) (GENDLER u. SPICER, 1995; MONIAUX et al., 2001). Die gelformenden Muzine sind verantwortlich für die rheologischen Eigenschaften des Mukus. Es handelt sich dabei um die größten bekannten Glykoproteine, die durch Disulfidbrücken Oligomere bilden und damit makromolekulare Strukturen mit Molekulargewichten von mehr als 40 MDa

bilden, die sich im Elektronenmikroskop als lange lineare Moleküle darstellen (SHEEHAN et al., 2000). MUC7 und MUC9 sind zwei sekretorische Muzine, die keine Polymere bilden. Ihre Vorstufen besitzen Molekulargewichte von 38 und 72 kDa (ARGÜESO u. GIPSON, 2001). MUC5AC ist speziell in den zytoplasmatischen Vesikeln der konjunktivalen Becherzellen lokalisiert (GIPSON u. INATOMI, 1998). Eine Lagerung dieser großen Moleküle ist nur möglich, indem die negativ geladenen und damit extrem hydrophilen Kohlenhydratketten durch eine hohe Kalziumkonzentration intrazellulär abgeschirmt werden. Werden die Muzine sezerniert, sinken die Kalziumspiegel, die Muzine können hydriert werden und schwellen sofort extrem an (VERDUGO, 1991). Die sekretorischen Muzine sind in der Tränenflüssigkeit gelöst und werden durch den Lidschlag zum Tränennasenkanal gebracht und besitzen damit eine Reinigungsfunktion (GIPSON, 2003).

Zu den Muzinen beim Hund ist bislang folgendes bekannt:

CARRINGTON et al. (1993) fanden beim augengesunden Hund mindestens zwei Muzingruppen. Anhand von Färbungen und Antikörperreaktionen konnte die Präsenz von membrangebundenen Kohlenhydraten, von sulfatierten Muzinen in einigen Becherzellen und die Produktion von verschiedenen Muzinen in den Becherzellvesikeln nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte das Vorkommen von zahlreichen Becherzellen mit heterogener Vesikelmorphologie (CARRINGTON et al., 1993). Das sekretorische Muzin bei Hund und Mensch besitzt zahlreiche Untereinheiten und kurze Oligosaccharid-Ketten (CORFIELD et al., 1997). HICKS et al. (1997) zeigten anhand von Dichtegradienten drei sezernierte Glykoproteine, bei denen es sich um zwei sekretorische und zwei membrangebundene Muzine handelte. Bei den sekretorischen Glykoproteinen wurden zwei Untereinheiten gefunden, von denen eine aber eine geringere Dichte von $<1,3\text{g/ml}$ als das typische Muzin aufwies. Dies lässt vermuten, dass diese Untereinheit eine Verbindung mit Lipiden eingeht. Die Lectinfärbung zeigte die Anwesenheit von Sialinsäure verbunden mit Fucose, Galactose und N-Acetyl-Hexamin. Alle diese Zucker sind typisch für Muzine (HICKS et al., 1997). Der isolierte Mukus vom Hundeaugen besteht zu 0,6- 0,9% in der Trockenmasse aus Sialinsäure, wovon 10- 30% durch acetylierte Sialinsäure gestellt wird. 9-O-acetylierte Ester von N-Acetylneuraminsäure repräsentieren einen großen Anteil der totalen Sialinsäuremenge, die in caninem okulärem Muzin gefunden wurde. Bei der Keratokonjunktivitis sicca ist der Anteil vermindert (CORFIELD et al., 2005). Durch Verwendung von Agarose-Gelen konnten HICKS et al. (1997) zeigen, dass natives sekretorisches okuläres Muzin Größen von über 10^7 Dalton mit Untereinheiten konstant

über 10^6 Dalton besitzt. Somit gehören die caninen sekretorischen Muzine zu den größten Muzinen. ROYLE et al. (2008) verglichen die Muzine von Mensch, Kaninchen und Hund. Beim Mensch sind die Muzine meist negativ geladen und enden mit einer Sialinsäure. Bei Hund und Kaninchen dagegen sind sie neutral und enden mit α -1-2-Fucose oder α -1-3-N-Acetylgalaktosamin. Die Kohlenhydrate sind meist kurz und bestehen aus Tetra-, Tri- oder Disacchariden (ROYLE et al., 2008). Polysaccharide werden auch als Glykane bezeichnet. ROYLE et al. (2008) zeigten, dass die okulären Glykane konstant kurz sind und zwischen zwei und sechs Monosaccharide enthalten. Der signifikante Unterschied zwischen Mensch, Hund und Kaninchen ist, dass beim Mensch sialylierte Glykane dominieren und nur 6% der Glykane nicht sialyliert sind. Hund und Kaninchen besitzen einen hohen Anteil an fucosylierten Glykanen. Die spezies-spezifische Glykan-Expression und die Unterschiede in der Sialylierung zwischen Hund, Mensch und Kaninchen ist eine Besonderheit des okulären Muzins und stellt vermutlich eine Anpassung an die unterschiedlichen Umweltbedingungen dar (ROYLE et al., 2008). Beim humanen Muzin enthalten die Muzinglykane zu 80% sialylierte Strukturen. Im Kontrast zu den humanen Glykanen sind beim Kaninchen weniger als 9% und bei Hunden weniger als 8% der Glykane sialyliert. Trotz der Dominanz von fucosylierten Glykanen bei Hund und Kaninchen wurden auch etwa 10% sialylierten Strukturen gefunden (ROYLE et al., 2008). Der Hund scheint ein geeignetes Modell für die Untersuchung des sekretorischen okulären Muzins zu sein, da man größere Mengen Muzin gewinnen kann und der Aufbau des caninen Muzins dem Modell der Muzinstruktur entspricht (HICKS et al., 1997).

2.2.3 Die wässrige Schicht

Die wässrige Schicht befeuchtet die Oberfläche und stellt das Medium für die in ihr gelösten Tränenfilmkomponenten dar. Eine Reduktion des Tränenvolumens geht somit mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit der verschiedenen Tränenbestandteile einher. Ferner ist die Sekretion zahlreicher Proteine eng mit der Sekretion der wässrigen Schicht assoziiert (KNOP u. KNOP, 2003). Einige Proteine gehen Interaktionen mit der Lipidschicht ein. Lipocalin ist das oberflächenaktivste Tränenprotein. Lactoferrin, Lysozym und Immunglobulin A interagieren mit den Lipiden, genauso wie Albumin, wobei dieses nur schwach interagiert. Die Menge an Protein, die von der Lipidschicht absorbiert werden kann, liegt in der Größenordnung von $0,5-1,0\text{mg/m}^2$ (MIANO et al., 2005). Der internationale Dry Eye Workshop definierte 2007 die Lacrimale Funktionelle Einheit (LFU). Diese besteht aus den Tränendrüsen, okulärer Oberfläche (Kornea, Konjunktiva und Meibom Drüsen), den Lidern und den sensorischen und motorischen Nerven, die sie vernetzen. Die Zellen der LFU

exprimieren tausende Proteine. Über 200 neue LFU-Proteine wurden im letzten Jahrzehnt entdeckt (McKOWN et al., 2009). Aufgrund seines hohen Proteingehaltes von über $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ beim Mensch rückte der Tränenfilm ins Interesse der Forschung. Er lässt sich leicht gewinnen und eine Änderung der Zusammensetzung oder des Proteingehaltes können pathologische Veränderungen anzeigen (DE SOUZA et al., 2006). Allerdings sind im Vergleich zu anderen Körperflüssigkeiten noch wenige Proteine des Tränenfilms identifiziert, da die bislang verwendeten Geräte zu unsensibel und die Zusammensetzung eine Herausforderung darstellt, da drei Proteine (Lipocalin, Lysozym und Laktoferrin) 80% des Gesamtproteingehaltes stellen. DE SOUZA et al. (2006) konnten 491 Proteine im humanen Tränenfilm identifizieren. In hoher Zahl waren Proteasen (32 Proteine), Protease Inhibitoren (32 Proteine) und Proteine, die antioxidativ (18 Proteine) wirken vertreten. Proteasen und Protease-Inhibitoren müssen in einem konstantem Gleichgewicht zueinander im Tränenfilm vorkommen, da ein Ungleichgewicht zu Erkrankungen der Augenoberfläche führen kann (DE SOUZA et al., 2006). Proteasen und Proteaseinhibitoren stellen die am stärksten repräsentierten funktionellen Gruppen dar, was ihre Wichtigkeit in Zusammenhang mit Abwehrmechanismen und Wundheilungsprozessen und der Immunabwehr als solches am Auge verdeutlicht (DE SOUZA et al., 2006). Proteine der Tränenflüssigkeit werden hauptsächlich von den Drüsenzellen produziert. Die sekretorischen Proteine werden vom endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, vom Golgi Apparat modifiziert, in sekretorischer Granula gespeichert und durch das Wirken von sekundären Botenstoffen freigesetzt. Die Produktion der sekundären Botenstoffe wird durch Signaltransduktion kontrolliert (DARTT, 1989). Agonisten, bei denen es sich in der Tränendrüse vor allem um Neurotransmitter handelt, binden an Rezeptoren in der basolateralen Membran der sekretorischen Zellen, wodurch Enzyme aktiviert werden und es zur Produktion der sekundären Botenstoffe kommt.

Drei verschiedene Wege können zu einer Stimulation der Sekretion von Proteinen in der Tränendrüse führen (DARTT, 1989):

- Der cyklische Adenosin-Monophosphat (cAMP)-abhängige Agonist (Vasointestinales Peptid (VIP), β -adrenerge Agonisten, α -Melanozyten Stimulierendes Hormon und Adrenocorticotropes Hormon) interagieren mit spezifischen Rezeptoren, wodurch es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase kommt, welche cAMP produziert. cAMP verursacht vermutlich über die Proteinkinase A die Exozytose der Proteine.

- Cholinerge Agonisten wie Norepinephrin und Epinephrin stimulieren die Proteinsekretion über M_4 Rezeptoren. Dies aktiviert die Phospholipase, welche Inositol Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-Biphosphat bildet. IP_3 verursacht die Freisetzung von Kalzium²⁺ aus den intrazellulären Speichern. Kalzium aktiviert die Proteinkinase C, woraufhin es zur Exozytose kommt. DAG bewirkt die Translokation der Proteinkinase C vom Cytosol zur Membran und versetzt sie so in einen aktiven Zustand.
- Die α_1 -adrenerge Agonisten stimulieren die Proteinsekretion durch spezifische Rezeptoren und führen zu einem Anstieg von IP_3 und DAG, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist.

Diese drei Signalwege können zusammen wirken und die Sekretion verstärken. VIP und die cholinergen Agonisten stimulieren neben der Proteinsekretion auch die Sekretion von Elektrolyten und Wasser. Die sekundären Botenstoffe stimulieren die Wassersekretion durch die Erhöhung der Aktivität der Ionenkanäle und der Ionentransportproteine. Wasser folgt dem Ionentransport passiv (DARTT, 1989). Ein Inhibitor der Proteinsekretion ist das exogene Opioid D-Ala²-Met-Enkephalnamide, ein Met-Enkephalin Derivat (CRIPPS u. PATCHEN-MOOR, 1988). Immunreaktion auf Met-Enkephalin wurde von LEHTOSALO et al. (1987) um die Tränendrüsenzellen nachgewiesen.

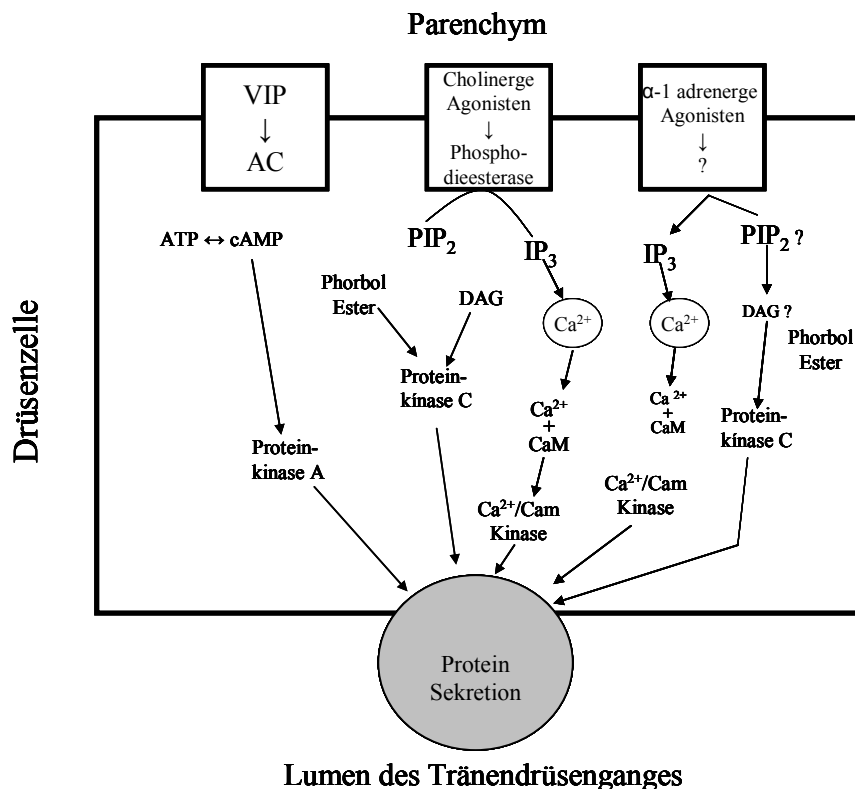


Abbildung 2: Model der Wege zur Stimulation der Proteinsekretion in der Tränendrüse (Quelle: DARTT, 1989)

Abk.: AC= Adenylatcyclase; ATP= Adenosintriphosphat, Ca^{2+} = Kalzium, CaM= Calmodulin; cAMP= cyclisches Adenosin-Monophosphat; DAG= Diacylglycerol, IP_3 = Inositol Triphosphat; PIP_2 = Phosphatidylinositol Biphosphat, VIP= Vasointestinales Peptid

Einige Proteine, wie IgA, IgM und IgG werden in die Tränenflüssigkeit unabhängig von der Sekretion synthetisiert. Daher fallen ihre Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit bei gesteigerter Tränenflussrate. Die Produktion anderer Proteine, wie Lactoferrin, Lipocalin und Lysozym wird der Sekretionsleistung der Tränendrüse angepasst, wodurch die Konzentration in der Tränenflüssigkeit konstant gehalten wird (FULLARD u. SNYDER, 1990).

Tabelle 1: Totalproteingehalt in der Tränenflüssigkeit von Hunden

Untersucher	Ergebnis
ROBERTS u. ERICKSON (1962)	0,31 g/dl
BARRERA et al. (1992b)	0,64 g/dl
GINEL et al. (1993)	0,65 g/dl

Abk.: g= Gramm, dl= Deziliter

DAVIDSON et al. (1992) konnten in der Tränenflüssigkeit von gesunden Katzen $5,81 \pm 2,29$ mg Protein/ml nachweisen. Der Proteingehalt war in Tränen, die mit der Kapillare gesammelt wurden, höher als in solchen, die mit Tränenstreifen gewonnen wurden. Die Viskosität der Tränenflüssigkeit ist entscheidend, da die Tränen viskös genug sein müssen, um die Augenoberfläche zu befeuchten und zu schützen, aber nicht so viskös, dass beim Lidschlag starke Scherkräfte entstehen, die das okuläre Epithel schädigen (GOUVEIA u. TIFFANY 2005). Die Viskosität spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Tränenfilmstabilität (GOUVEIA u. TIFFANY, 2005). Einzelne Proteine besitzen meist kugelige Struktur und sind zu klein, um hohe Viskositäten zu verursachen. Daher vermuten unter anderem GOUVEIA u. TIFFANY (2005), dass es zu zahlreichen Interaktionen der Proteine untereinander, mit den Lipiden und anderen Bestandteilen des Tränenfilms kommt. Lysozym und Laktoferrin zeigen ungewöhnliche Oberflächenladungen, was elektrostatische Interaktionen zwischen den Proteinen begünstigt. Lysozym und Laktoferrin besitzen beim physiologischen pH-Wert der humanen Tränen eine positive Ladung, die anderen Haupttränenproteine sind dagegen negativ geladen. In vivo könnten zusätzlich noch weitere Interaktionen mit kleinerer Proteinspezies und hydrophobe Interaktionen auftreten (GOUVEIA u. TIFFANY, 2005). Diese Interaktionen zwischen denen im Tränenfilm auftretenden Proteinen führen zu deutlichen Kräften, die zur Viskosität beitragen könnten. Normalerweise besitzt der Tränenfilm nicht-newtonsche Fließeigenschaften. Werden die Lipide aus der Tränenflüssigkeit entfernt, verliert der Tränenfilm diese Eigenschaft. Durch erneutes Zusetzen der Lipide erlangt er sie wieder (GOUVEIA u. TIFFANY, 2005). Die Bindung von Lipiden an das Lipocalin trägt ebenfalls zur Viskosität der humanen Tränen bei. Freie Lipide konnten in der Tränenflüssigkeit nicht nachgewiesen werden (GOUVEIA u. TIFFANY, 2005).

Die wässrige Tränenschicht besitzt verschiedene lösliche antimikrobielle Faktoren, die die okuläre Oberfläche schützen (DAVIDSON u. KUONEN, 2004). Fünf Proteine sind quantitativ besonders stark vertreten:

2.2.3.1 Lysozym

Lysozym findet sich im menschlichen Körper neben der Tränenflüssigkeit noch im Speichel, Schweiß, Nasensekret und dem Cerumen. Die Konzentration von Lysozym ist in der Tränenflüssigkeit höher als in jeder anderen Körperflüssigkeit (FLEMING, 1922; VAN HAERINGEN, 1981). In der Tränenflüssigkeit des Menschen liegt die Konzentration laut PIETSCH u. PEARLMAN (1973) bei 1-2g/l. Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren und

besitzt ein Molekulargewicht von 14.388 Dalton. Es weist eine globuläre Struktur mit fünf alpha-Helices und fünf beta-Faltblättern auf, dessen Gesamtstruktur durch vier Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten stabilisiert wird. Die Produktion erfolgt in der Tränendrüse (PERAL et al., 2008). Lysozym stellt 20-40% des totalen Tränenproteingehaltes (FARRIS, 1985). Es wirkt bei grampositiven Bakterien antibakteriell, da es in der Lage ist β -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin in den Zuckerketten des Peptidoglykangerüsts der Bakterienzellwand abzubauen, wodurch es zur Lyse der Bakterien kommt (VAN HAERINGEN, 1981). Zudem bildet das basische Lysozym zusammen mit dem sauren Albumin ein Puffersystem für den pH-Wert des Tränenfilms (KNOP u. KNOP, 2005). MUDGIL et al. (2006) vermuten, dass Lysozym auch dazu beiträgt, die Oberflächenspannung am Auge zu senken, da es an der Augenoberfläche Lipide absorbieren und in die Lipidschicht penetrieren kann.

2.2.3.2 Lipocalin (Tränen-spezifisches Präalbumin)

Die Lipocaline sind eine Familie von lipidbindenden Proteinen. Das humane Lipocalin ist ein sekretorisches Protein, welches besonders in den Flüssigkeiten der epithelialen Oberflächen vertreten ist (GACHON u. LACAZETTE, 1998). Lipocalin wurde auch in humanen Speichel, Schweiß, nasalen und respiratorischen Sekreten, der Prostata und der Hypophyse nachgewiesen (GOUVEIA u. TIFFANY, 2005). In den Tränen findet sich hauptsächlich Tränen-Lipocalin und in kleineren Mengen apo-Lipoprotein-D (HOLZFEIND et al., 1995). Tränen-Lipocalin (TL) wurde früher Tränenspezifisches Präalbumin genannt. TL ist eines der Haupttränenproteine, wird von der Tränendrüse produziert und stellt 15-33% der Gesamtproteinmenge in der Tränenflüssigkeit (REDL, 2000; FULLARD u. SNYDER, 1990). Es kommt in einer holo- und einer apokrinen Isoformen vor, wobei apo-TL oberflächenaktiver ist als holo-TL und ein Molekulargewicht zwischen 17 und 18 kDa besitzt (GLASGOW et al., 2002). YAMADA et al. (2005) fanden beim gesunden humanen Probanden einen TL-Gehalt von 1,54mg/ml bei einem Gesamtproteingehalt von 9,48mg/ml. Die TL-Konzentration korreliert positiv mit der Tränenfilm-Aufreißzeit und negativ mit Fluoreszeinfärbungen (YAMADA et al., 2005). Die niedrige Oberflächenspannung und die non-Newtonian Fließeigenschaften der Tränen ist ein Resultat der Komplexe von TL mit Tränenlipiden (GLASGOW et al., 2002; TIFFANY u. NAGYOVA, 2002). Die Tränen-Lipidschicht ist von ihrem Aufbau her ein für Störungen anfälliges System. Freie Fettsäuren in der wässrigen Schicht könnten gebunden werden und den regelmäßigen Aufbau zerstören (MILLAR et al., 2009). Tränen-Lipocalin ist das Haupt-Lipidbinde-Protein in den Tränen und man

vermutet, dass es eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Lipidschicht spielt, indem es Lipide aus der wässrigen Schicht und der Augenoberfläche zur Lipidschicht bringt oder absorbiert. TL interagiert mit neutralen, kationischen und anionischen Membranen und ist in der Lage in die Lipidschicht einzudringen (MILLAR et al., 2009; GLASGOW et al., 2002). Auch beseitigt es Lipide von der Kornea und verhindert so trockene Stellen, da eine Lipidkontamination zu einer schlechteren Benetzbarkeit und einer Desikkation des Epitheliums führt (GLASGOW et al., 2002). Tränen-Lipocalin hat eine hohe Affinität zu relativ unlöslichen Lipiden (GLASGOW et al., 2002) und bindet einen breiten Bereich von Lipiden, wie Cholesterin, Fettsäuren, Phospholipide und Glykolipide (GOUVEIA u. TIFFANY 2005; GLASGOW et al., 2002; REDL, 2000). Die Verbindung von TL mit den Phospholipiden hat eine entscheidende Rolle bei der Tränenfilmstabilität (GLASGOW et al., 2002). Zwischen Lipocalin, Lysozym und Lactoferrin bestehen zusätzlich starke elektrostatische Interaktionen (GASYMOV et al., 1999). Lipocalin zeigt keine Aktivität beim Transfer von neutralen oder polaren Lipiden zwischen Lipidvesikeln oder Lipoproteinen. Es scheint also kein Haupt-Lipid-Transfer-Protein zu sein, wie zunächst von GLASGOW et al. (1999) vermutet (SAAREN-SEPPÄLÄ et al., 2005). Das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) besitzt eine effizientere Lipidtransferaktivität als Lipocalin, welches Lipide nur im Verhältnis 1:1 binden kann (SAAREN-SEPPÄLÄ et al., 2005). Bei Erkrankungen der Tränendrüse kommt es durch geringere Mengen an Lipocalin auch zu Störungen bei diesen protektiven Mechanismen (GLASGOW et al., 1999). TL übt auch inhibitorische Aktivität auf Proteinasen und potentiell schädliche Substanzen, wie Lipide und Peroxidaseprodukte aus, indem es sie bindet. Es besitzt an der Augenoberfläche eine Funktion als genereller Schutz der Epithelien und entwickelt antiinflammatorische und antimikrobielle Aktivität (REDL, 2000). Es gibt Hinweise, dass es auch das bakterielle Wachstum hemmt (FLUCKINGER et al., 2004). Sowohl Bakterien als auch Pilze benötigen Eisen zum Wachstum und produzieren dazu Siderophore, um das Eisen nutzen zu können. Die Hemmung der Eisenaufnahme durch Abfangen der mikrobiellen Siderophoren ist ein wirkungsvoller Mechanismus in der Abwehr von mikrobiellen Infektionen. TL bindet ein breites Spektrum an bakteriellen und fungalen Siderophoren mit hoher Affinität, was mit einer generellen Aufräumfunktion vereinbar ist. Die Abwehr von fungalen Organismen ergänzt die zahlreichen Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen am Auge. In vivo zeigte TL eine stärkere Inhibition von fungalem als von bakteriellem Wachstum (FLUCKINGER et al., 2004).

2.2.3.3 Lactoferrin

Das Lactoferrin ist ein eisenbindendes Glykoprotein und kommt in exokrinen Sekreten wie Milch, Tränenflüssigkeit, Speichel, gastrointestinalen und bronchialen Flüssigkeiten, Sperma sowie weißen Blutkörperchen vor (WEINBERG, 2001). Es besitzt antibakterielle, antimykotische, antivirale, antineoplastische und antiinflammatorische Wirkung und wirkt auch als Antioxidans (WEINBERG, 2001; FLANAGAN u. WILLCOX, 2009). Für den Tränenfilm wird es von den Drüsenzellen der Tränendrüse (FLANAGAN u. WILLCOX, 2009) produziert. Lactoferrin wurde in einer Konzentration von 1,6ng/ml in humanen Tränen gefunden (OHASHI et al., 2006). Lactoferrin entfaltet seine antimikrobielle Wirkung, indem es freies Eisen bindet und damit die Verfügbarkeit von Eisen, welches für mikrobielles Wachstum essentiell ist, vermindert. Auch der Befall von Epithelzellen durch Viren wird durch Bindung mit Lactoferrin verhindert (FLANAGAN u. WILLCOX, 2009). Zudem dämpft Lactoferrin die Aktivierung des Immunsystems, indem es Entzündungsmarker und pathogen-assoziierte Strukturen wie Lipopolysaccharide bindet (FLANAGAN u. WILLCOX, 2009).

2.2.3.4 Albumin

Albumin kommt in der Tränenflüssigkeit im Vergleich zum Serum nur in sehr geringen Mengen vor. Die Konzentration kann durch eine konjunktivale Reizung, trockene Augen oder bei geschlossenem Auge deutlich ansteigen (LUENSMANN u. JONES, 2008). Albumin ist ein 66 kDa großes Protein. Es ist im Gegensatz zu Lysozym negativ geladen und kann dadurch andere Pathogene als Lysozym binden (LUENSMANN u. JONES, 2008).

2.2.3.5 Immunglobulin A (IgA)

Immunglobulin A in seiner sekretorischen Form ist das Immunglobulin mit der höchsten Konzentration in den Tränen. Daneben kommen noch IgG, IgM und IgE in der Tränenflüssigkeit vor. IgA ist auch in anderen mukösen Sekreten, wie Speichel, nasalen und bronchialen Flüssigkeiten, Kolostrum, Milch und den Sekretionen des Magen-Darm-Traktes das häufigste Immunglobulin (SCHLEGEL et al., 2003). Produziert wird IgA vermutlich hauptsächlich lokal in den Plasmazellen der Tränendrüse (SULLIVAN u. ALLANSMITH, 1984), während die anderen Immunglobuline vermutlich aus dem Blutkreislauf stammen (PEPPARD u. MONTGOMERY, 1987) und verstärkt bei Entzündungen und Reizungen der Konjunktiva auftreten.

SCHLEGEL et al. (2003) konnten IgA-positive Plasmazellen im konjunktivalen Oberflächenepithel und in der Nickhautdrüse bei verschiedenen Tierarten (Hund, Katze,

Schwein, Rind, Ziege und Pferd) spezies-spezifisch nachweisen. Zudem konnten SCHLEGEL et al. (2003) eine starke Expression der sekretorischen Komponente in den Becherzellen von Hunden, Pferden und Schweinen nachweisen. SCHLEGEL et al. (2003) vermuten daher, dass die Becherzellen in der Lage sind eine humorale Immunantwort auszuführen und somit ein wichtiger Teil des sekretorischen Immunsystems bei Hund und Pferd darstellen.

Das sekretorische IgA (sIgA) besteht aus zwei IgA-Molekülen, einem kleinem Glykoprotein, der sogenannten J-Kette und einem Polypeptid mit einer Molekülmasse von 70kDa, der sekretorischen Komponente. Die gebundene sekretorische Komponente ist für den Transport durch die Epithelzelle nötig und schützt IgA vor proteolytischem Abbau (MESTECKY, 1988). Das sIgA spielt eine wichtige Rolle in der spezifischen Immunabwehr am Auge und scheint auch die unspezifischen Abwehrmechanismen durch Lactoferrin und Lysozym zu beeinflussen (PERRA et al., 1995). Zu den antibakteriellen Wirkmechanismen von sIgA zählen Agglutination, direkte Tötung, Minderung der Adhäsion und Invasion, Inaktivierung von bakteriellen Enzymen und Toxinen, Opsonierung und zellvermittelte Reaktionen (SULLIVAN u. ALLANSMITH, 1984). Die von sIgA vermittelte antivirale Wirkung beruht auf einer Virusneutralisierung sowie einer verminderten Adhäsion und Invasion (SULLIVAN u. ALLANSMITH, 1984). Die Zahl der IgA spezifischen Zellen unterliegt beim Mensch der Androgenstimulation und ist bei Männern höher als bei Frauen. Daneben steuern noch Prolaktin, Substanz P, das vasointestinale Peptid und Zytokine (Interferon- γ und Tumor Nekrose Faktor) die Sekretion der IgA Moleküle (KRENZER et al., 2000). DAY (1996) untersuchte anhand Immunelektrophorese die Tränen von Hunden auf den Gehalt von Immunglobulinen. Der Deutsche Schäferhund zeigte eine signifikant geringere Konzentration von Immunglobulin A in der Tränenflüssigkeit als andere Hunderassen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Immunglobulingehalte in der Tränenflüssigkeit gesunder Hunde im Vergleich zum Deutschen Schäferhund nachgewiesen durch Immunelektrophorese

Rasse	ImmunglobulinA (mg/ml)	ImmunglobulinG (mg/ml)	ImmunglobulinM (mg/ml)
Deutscher Schäferhund	0,28	0,25	0,01
Andere Rassen	1,02	0,61	0,02

Quelle: DAY (1996); Abk: mg= Milligramm, ml = Milliliter

Tabelle 3: Immunglobulingehalte in der Tränenflüssigkeit gesunder Hunde nachgewiesen durch Immunelektrophorese

	ImmunglobulinA (mg/ml)	ImmunglobulinG (mg/ml)	Immunglobulin M
50 gesunde Hunde	0,25	0,23	Konnte in keiner Probe nachgewiesen werden

Quelle: GINEL et al. (1993); Abk: mg= Milligramm, ml = Milliliter

Bei den Untersuchungen mittels Immunelektrophorese und Immunodiffusion von GINEL et al. (1993) war die Immunglobulin A-Konzentration signifikant vom Alter des Hundes abhängig. Die mittlere Konzentration des Gesamt-Proteingehaltes lag bei $0,65 \pm 0,06$ g/dl. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt zwischen den Altersgruppen oder dem Geschlecht gefunden werden. IgA stellte 4,89% des Gesamt-Proteingehaltes. Hunde, die über 18 Monate alt waren, zeigten signifikant höhere IgA Konzentrationen. IgG stellte 4,67% des Gesamtproteins. Obwohl ältere Hunde die Tendenz zu höheren IgG-Gehalten in der Tränenflüssigkeit zeigten, war dies nicht statistisch signifikant.

2.2.3.6 Sonstige Bestandteile

Neben Wasser und verschiedenen Elektrolyten enthält diese Schicht zahlreiche verschiedene Proteine, zu denen Wachstumsfaktoren, Zytokine, angiogene Modulatoren und Enzyme zählen (KLENKLER et al., 2007).

Tabelle 4: Weitere Bestandteile des wässrigen Anteils des Tränenfilms

Bestandteil	Funktion	Autor
Antimikrobielle Peptide Defensin Cathelicidin LL-37 Lingual antimicrobial Peptid (LAP) Tracheal antimicrobial Peptid (TAP) Thymosin-β4 Histatins Humanes natriuretic Peptid Dermcidin Heparin (LEAP-1, LEAP-2) Humanes Epididymis Protein (HE2α, HE2β1) Verschiedene Chemokine (CXCL9,10,11, CXCL4, CTAP-3, CCL5, CCL28, CCL20)	Entfalten potente antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Pilze und einige Viren, vor allem durch Zerstörung der mikrobiellen Membran. Einige besitzen zusätzliche biologische Effekte und wirken bei Chemotaxis, Angiogenese und der Unterdrückung von Entzündungen mit.	McDERMOTT (2004)
Cationic antimicrobial Protein 37	Aufgrund der Größe zählt es nicht mehr zu den Peptiden und wirkt antimikrobiell.	RUAN et al. (2002)
Fibronectin	Förderung der Wundheilung.	FUKUDA et al. (1996)
Hydrolasen (32 Stück) u.a. Metalloproteinase 8 Apolipoprotein B Lactotransferrin Plasminogen Cathepsin B Neuraminidase	Funktionen bei der Immunabwehr des Auges.	DE SOUZA et al. (2006)
Lacritin	Wachstumsfaktor für korneale Epithelzellen.	McKOWN et al. (2009)
Proteinasen Neutrophile Elastase (NE) Matrix Metalloproteinasen (MMP)	NE ist die häufigste Proteinase in humanen Tränen. Sie wurde auch in den Tränen von Hund und Pferd nachgewiesen. Produziert wird sie von Neutrophilen und Makrophagen. Sie zersetzt Kollagen, Laminin und Fibronectin. Bei schweren Verletzungen der Kornea ist die Proteinaseaktivität im Tränenfilm signifikant gesteigert. MMP-2 wird von kornealen Keratozyten produziert und übt Kontrollfunktion in der normalen Kornea aus. MMP-9 wird von epithelialen Zellen und Neutrophilen verstärkt produziert, nachdem es an der Kornea zu Verletzungen kam. Sie haben wichtige Funktionen bei Umbau und Abbau von kornealem Stroma. Durch einen Mangel an wässrigem Tränenfilm, kommt es zu einer vermehrten Expression von MMP-1, -3, -9 und -10 bei der Maus.	OLLIVIER et al. (2007) STRUBBE et al. (2000) GILGER (2008) CARTER et al. (2007) CORRALES et al. (2006)

Fortsetzung Tabelle 4

Bestandteil	Funktion	Autor
Protease Inhibitoren α -1-Proteinase Inhibitor α -2-Makroglobulin Cystatin S Latexin Prosaposin	In Kornea und Tränenfilm präsent, um einen unnötigen Abbau von normalem, gesunden Gewebe zu verhindern.	OLLIVIER et al. (2007) TWINING et al. (1994) DE SOUZA et al. (2006)
Substanz P (SP)	Ein irritativer Reiz auf der Augenoberfläche führt zu einer Freisetzung von sensorischen Neuropeptiden. Dies stimuliert vermutlich autokrin die Becherzellsekretion. SP konnte auch in der Tränenflüssigkeit von gesunden humanen Probanden nachgewiesen werden, allerdings enzymatisch verändert, wodurch die erwünschten trophischen Eigenschaften erhalten bleiben und unerwünschten Effekte verhindert werden.	DARTT et al. (1995) YAMADA et al. (2002) KOVACS et al. (2005)
Transferrin	Hat ähnliche Aufgaben wie Lactoferrin, kommt aber in deutlich geringerer Menge in den Tränen vor. Sein Vorkommen in den Tränen resultiert aus einem passiven Transport mit Serumproteinen.	AISEN u. LEIBMAN (1972)
Zytokine Interleukin-1 α (IL-1 α) Interleukin-1 β (IL-1 β) Interleukin-6 (IL-6) Interleukin-8 (IL-8)	Die entzündlichen Zytokine werden nicht nur bei entzündlichen Prozessen produziert und sind an der kornealen Wundheilung beteiligt, sondern auch unter normalen Bedingungen präsent. IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 konnten auch in Tränenflüssigkeit von gesunden Menschen nachgewiesen werden. Sie werden von kornealen Zellen und Entzündungszellen produziert und sind mit den Wachstumsfaktoren am Wachstum und der Migration der kornealen Epithelzellen beteiligt.	NAKAMURA et al. (1998)
Moleküle, die gegen reaktive oxygene Spezies wirken (18 Stück), u.a. Superoxid Dismutase Sauerstoff-reguliertes Protein 1	Anti-Oxidantien, Beseitigung von freien Radikalen.	DE SOUZA et al. (2006) BEHNDIG et al. (1998)
Phospholipid Transfer Protein	Vermutlich Funktion bei der Formation des Tränenfilms, da es am Lipidtransfer beteiligt ist.	JAUHIAINEN et al. (2005)
Wachstumsfaktoren Epidermal growth factor- β Transforming growth factor Hepatocyte growth factor Platelet-derived growth factor Vascular endothelial growth factor Nerve growth factor (NGF) Fibroblast growth factor Keratinocyte growth factor Insulin-like growth factor	Erhaltung der Gewebe-Homeostase am Auge durch autokrinen und parakrinen Einfluss auf die Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben der Zellen an der okulären Oberfläche. Die Wachstumsfaktoren sind in die physiologischen Funktionen der Kornea involviert, besonders bei der Erhaltung der kornealen Transparenz. NGF induziert eine Zunahme der Anzahl der Becherzellen, sowie die MUC5AC Produktion, Lagerung und Freisetzung.	IMANISHI et al. (2000) KLENKLER et al. (2007) WOO et al. (2005) LAMBIASE et al. (2009)

Fortsetzung Tabelle 4

Bestandteil	Funktion	Autor
TFF Peptide (Trefoil Factor Family-Peptide). Es sind drei humane TFF-Peptide bekannt, die als TFF1, TFF2 und TFF3 bezeichnet werden.	Diese Peptidfamilie wird von Schleim produzierenden Epithelien sezerniert. TFF-Peptide beschleunigen Zellwanderungsprozesse, sie wirken anti-apoptotisch und modulieren entzündliche Prozesse. TFF1 und TFF3 werden in der humanen und der porcinen Konjunktiva in den Becherzellen sezerniert; TFF2 wird am Auge nicht synthetisiert. TFF1 ist ein Protease-resistentes Peptid, welches konjunktivale Zellen vor Apoptose schützt. Bei Entzündungen ist es hochreguliert und scheint protektive Funktion zu besitzen. TFF3 wird auch von den Epithelzellen der efferenten Tränenwege produziert und hat vermutlich besondere Funktion beim Tränentransport. TFF-Peptide und Muzine interagieren und beeinflussen die rheologischen Eigenschaften des Augenmukus und des Tränenfilms.	PAULSEN et al. (2002) OEN et al. (2006) BURON et al. (2008)
Aquaporin (AQP) (Familie aus 10 homologen Wassertransportproteinen)	In der Kornea von Mammalia wird AQP1 in den Endothelzellen und AQP5 in den Epithelzellen gebildet. AQP1 ist am Erhalt der kornealen Transparenz beteiligt und könnte auch eine Rolle bei der Zellwanderung spielen. AQP5 ist essentiell für den stromalen Wasserhaushalt.	LEVIN u. VERKMAN (2006)
Zystischer-Fibrose-Transmembran-Regulator	Involviert in den Ionentransport durch das korneale Epithel.	LEVIN u. VERKMAN (2006)
Glycoprotein 340	Dieses muzinähnliche Protein trägt zum Schutz der okulären Oberfläche bei, indem es Bakterien abfängt.	JUMBLATT et al. (2006)
Phospholipase A2	Kalzium-abhängiges Enzym, welches im Tränenfilm bakterizid gegen Staphylokokken und andere gram-positive Bakterien wirkt.	QU u. LEHRER (1998)
Cystatin	Kontrolle der Proteinase-Aktivität.	BARKA et al. (1991)
Lysosomale Enzyme Saure Phosphatase Beta-D-Glucuronidase N-Acetyl-beta-D-Glucosamidase Alpha-D-Mannosidase Beta-Hexosaminidase	Diese Enzyme zeigen im Tränenfilm eine höhere Aktivität als im Serum.	KITAOKA et al. (1985) ANDERSSON et al. (2006)
Laktat Dehydrogenase	Wird vermutlich vom kornealen Epithelium gebildet. Vermutlich immunologische Wirkung.	KAHAN u. OTTOVAY (1975)
Amylase, Peroxidase	Vermutlich antibakterielle Wirkung.	VAN HAERINGEN (1975 u. 1979)

2.2.4 Die Lipidschicht

Die Lipidschicht ist die äußerste Schicht des Tränenfilms. Sie dient der Hemmung und Reduktion der Verdunstung der wässrigen Schicht, sorgt für eine glatte optische Oberfläche, erleichtert die Bewegung der Augenlider beim Blinzeln und verhindert die Verunreinigung des Tränenfilms durch Schmutzpartikel. Zusätzlich stabilisiert sie den Tränenfilm, da sie die Oberflächenspannung senkt, indem sie mit lipidbindenden Proteinen, wie dem Lipocalin interagiert (BRON et al., 2004; OFRI et al., 2007b; McCULLEY u. SHINE, 2002; ISREB et al., 2003). Produziert wird die Lipidschicht hauptsächlich von den Meibom-Drüsen, bei denen es sich um modifizierte Talgdrüsen handelt, die sich in den Lidern befinden. KASWAN (1984) konnten allerdings beim Hund auch in der Nickhautdrüse lipidhaltige Zellen nachweisen (siehe auch Kapitel 2.1.2.). Das Sekret der Meibom-Drüsen hat einen niedrigeren Schmelzpunkt als Talg, so dass es bei Körpertemperatur seinen flüssigen Zustand behält (BRON et al., 2004). Da das Meibom Sekret eine Mischung aus verschiedenen Lipiden ist, gibt es keinen einzelnen Schmelzpunkt, sondern einen Schmelz-Bereich. Das Vorkommen von verzweigten und ungesättigten Fettsäuren senkt diesen Bereich auf Temperaturen zwischen 19,5 und 32,9°C (TIFFANY et al., 1989). Die Lieferung des Meibom Sekretes zum Lidrand erfolgt hauptsächlich durch kontinuierliche Sekretion unter neuronaler und hormoneller Kontrolle, unterstützt durch den Lidschlag. Das Reservoir am Lidrand bildet eine hydrophobe Barriere um das Überlaufen der Tränen und eine Kontamination durch Hautlipide, welche den Tränenfilm destabilisieren könnte, zu verhindern. Zusätzlich geben sie den Weg für die Lipidexkretion vor (BRON et al., 2004). Die Anforderung der reversiblen Kompression und der folgenden Expansion, ohne den Verlust der Intaktheit, ist essentiell für die Lipidschicht des Tränenfilms (McCULLEY u. SHINE, 2002). Ein Monolayer würde aufgrund des hohen Druckes, wie er durch den Lidschlag erzeugt wird, kollabieren. McCULLEY u. SHINE (2002) konnten bei In-vitro-Studien zeigen, dass nur für mehrlagige Lipidschichten eine reversible Verformung möglich ist. McCULLEY u. SHINE (2002) beschreiben die Lipidschicht als Bi- oder Trilayer, bestehend aus zwei Lipidanteilen, einer dünnen polaren Phase und einer dicken nicht-polaren Phase. BRON et al. (2004) sehen die Funktion der Lipidschicht ähnlich einer Ziehharmonika. Die Dicke der Lipidschicht wurde beim Mensch ursprünglich auf 100 nm am offenen Auge geschätzt (McDONALD, 1968). Die Dicke der Lipidschicht hängt von mehreren Faktoren ab, unter anderem der Funktion der Meibom-Drüsen, der Komposition der Meibom Sekrete, der Lidschlagfrequenz, der Weite des Lidspaltes und der Umgebungsfeuchtigkeit (ISREB et al., 2003). Eine dickere

Lipidschicht (über 120 nm) ist erwünscht und korreliert mit einer optimalen Tränenfilmstabilität. Dünne Lipidschichten (unter 60 nm) führen dagegen zu einer Instabilität des Tränenfilms mit ansteigenden Verdunstungsraten, einer höheren Osmolarität und Augenbeschwerden (ISREB et al., 2003). Die Menge der Lipide steigt mit dem Alter beim Mensch an (CHEW et al., 1993). Beim Mann ist der Lipidgehalt in der Tränenflüssigkeit höher als bei der Frau, was einen hormonellen Einfluss vermuten lässt. Sowohl Androgen- (ROCHA et al., 2000; WICKHAM et al., 2000) als auch Östrogenrezeptoren (WICKHAM et al., 2000) konnten an den Meibom Drüsen nachgewiesen werden. Zirkulierendes Androgen ist essentiell für eine normale Meibom-Drüsen Funktion. BRON et al. (2004) schätzen, dass sich beim gesunden Mann 300µg Meibom-Lipide im Reservoir und 9µg im Tränenfilm befinden. OFRI et al. (2007b) ermittelten mithilfe des Meibometers die Menge des Lipids, welche sich zwischen einem Lidschlag am Lidrand des Hundes befindet. Sie drückten die gemessenen Mengen in Meibometer Einheiten (MU) aus. Es ergab sich eine mittlere Meibom Sekret-Menge von 179 ± 60 MU beim Hund. Beim Mensch finden sich mittlere Mengen von 141 MU (CHEW et al., 1993). STUCHELL et al. (1984) konnten in normalen humanen Tränen 0,133mg/ml Lipide nachweisen. Die Analyse von Meibom Lipiden gesunder Menschen, Haus- und Labortieren zeigte bei allen eine Komposition aus nicht-polaren Lipiden und einer geringeren Menge polarer Lipide. Es handelt sich bei der genauen Zusammensetzung der Lipidschicht weniger um einzelne Lipide als um Lipidfamilien, die in bestimmten Anteilen vorkommen. Veränderungen in der Zusammensetzung der Anteile haben entscheidende Effekte auf die Stabilität der Lipidschicht an der Oberfläche. Es wird vermutet, dass bestimmte Verhältnisse in der Zusammensetzung der Lipidschicht mit Krankheitssymptomen einhergehen und andere wiederum mit einer stabilen Lipidschicht korrelieren. Derzeit stehen die einzelnen Mitglieder der Lipidfamilien mit ihrem genauen molekularen Aufbau im Interesse der Forschung (BUTOVICH et al., 2008).

2.2.4.1 Polare Phase

Die polare Phase dient als strukturelle Matrix für die aufliegende nicht-polare Phase. Es handelt sich um kurzkettige, gesättigte Fettsäuren, da länger-kettige, verzweigte oder ungesättigte Fettsäuren zu Instabilitäten führen können (McCULLEY u. SHINE, 1997). Es finden sich polare Phospholipide, wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidyl-Cholin, Sphingomyelin sowie Cerebroside. Triglyceride kommen in einer Konzentration von 3-5% vor (McCULLEY u. SHINE 1997). Einige Triglyceride und Wachsester bilden Brücken zwischen der polaren und der nicht-polaren Phase. Die strukturelle Stabilität der polaren

Phase ist vom passenden Verhältnis der polaren Lipidkomponenten, Ionen (wie Kalzium, Kalium, Chlorid und Bikarbonat) und dem pH-Wert abhängig (McCULLEY u. SHINE, 1997). Ein ansteigender pH-Wert (über pH 8) und das Vorkommen von Kalzium-Ionen kann dazu führen, dass Phosphatidylethanolamin nicht mehr in der Lage ist Wasserstoffbrücken zu bilden, was essentiell für die strukturelle Stabilität ist (McCULLEY u. SHINE, 1997).

2.2.4.2 Nicht-Polare Phase

Die nicht-polaren Lipide stellen den größten Anteil der Lipidschicht (BRON et al., 2004). Es handelt sich größtenteils um Wachsester, Cholesterinester, Kohlenwasserstoffe und Triglyceride (McCULLEY u. SHINE, 2002). Die längerkettigen Kohlenwasserstoffe (C28) erhöhen nicht nur Festigkeit der Lipidschicht, sondern senken auch die Wasserverdunstungsrate. Zusätzlich kontrolliert diese Phase die Durchgangsrate von Kohlendioxid, Sauerstoff und Ionen und dient als Reservoir für Triglyceride und andere polare Lipide und sichert so die optimale Stabilität der polaren Phase. Die freien Fettsäuren sind eine Mischung aus kurzen und langen Fettsäuren. Einen kleineren Anteil bilden die Diglyceride, die durch hydrolytische Aktivität aus Lipidvorstufen entstehen (McCULLEY u. SHINE, 2002).

2.3 Klinische Untersuchungsmöglichkeiten des Tränenfilms

2.3.1 Standarduntersuchungen für den Tränenfilm

Beim Mensch stellt die Anamnese einen wichtigen Teil der Untersuchung des Tränenfilms dar. Vom trockenen Auge betroffene Menschen beschreiben häufig Trockenheits- oder Fremdkörpergefühl, Brennen, Jucken und exzessive Schleimproduktion (PERRY, 2008). Beim Hund berichtet der Besitzer meist von einem vermehrten Blinzeln, Reiben der Augen über den Teppich oder gelblichen Ausfluss (SANCHEZ et al., 2007). Derzeit steht für die Diagnosestellung eines trockenen Auges kein einzelner zuverlässiger Test zur Verfügung. Von manchen Autoren wird die Osmolarität des Tränenfilms als Goldstandard definiert (MESSMER, 2007). Die Diagnose des trockenen Auges stützt sich aber weitestgehend auf die typische Anamnese und die klinischen Zeichen der Entzündung und der Oberflächenschädigung. Die humanmedizinische Vereinigung „tearfilm & ocular surface society“ hat beim „International Dry Eye Work Shop“ 2007 für den Mensch einen umfangreichen Fragenkatalog erarbeitet. Dabei werden Vorbericht, klinische Symptome und

die Lebens- bzw. Arbeitsbedingungen genau erfragt, um die Diagnose zu stellen und zu sichern (www.tearfilm.org/dewsreport).

2.3.1.1 Schirmer-Tränen-Test (STT)

Trotz Unbeständigkeit und schlechter Reproduzierbarkeit ist der Schirmer-Tränen-Test-I die Standarduntersuchung für die Quantität des wässrigen Tränenfilmanteils (ISREB et al., 2003; HARTLEY et al., 2006). Es wird nicht nur das Tränenvolumen und die basale Tränenproduktion, sondern auch die irritative Reflexlakrimation gemessen. Der Schirmer-Tränen-Test sollte bei jeder Erkrankung der Augenoberfläche durchgeführt werden, da jede Konjunktivitis oder Keratitis durch eine Veränderung des Tränenfilms verursacht sein kann (SANCHEZ et al., 2007). Der Schirmertest wurde von Otto Schirmer 1903 in die Ophthalmologie eingeführt. 1962 wurde der Schirmer-Tränen-Test beim Hund vorgestellt (ROBERTS u. ERICKSON, 1962). Die Technik wurde mehrfach modifiziert und wird heute mit einem standardisierten, kommerziell hergestellten Fließpapierstreifen durchgeführt. Der Streifen wird für eine Minute in den Bindehautsack eingelegt und die Länge des benetzten Papiers nach dieser Zeit gemessen. Der Test sollte am Anfang der ophthalmologischen Untersuchung stehen und am wachen Tier durchgeführt werden. STT I Werte zwischen 15 mm/Min und 25 mm/Min werden als normal angesehen (GELATT, 2007; HIRSH u. KASWAN, 1995; WYMAN et al., 1995; BERGER u. KING, 1998). STT I Werte zwischen 10 und 15 mm/Min gelten als erniedrigt, können bei normalem Lidreflex und Lidschluß aber noch klinisch unauffällig sein. Werte zwischen 5 und 10 mm/Min lassen auf eine Keratokonjunktivitis sicca (KCS) schließen (KASWAN u. SALISBURY, 1990). Beim Mensch wird der STT I über fünf Minuten durchgeführt. Physiologisch liegen die gemessenen Werte zwischen 10-20 mm. Eine Befeuchtungsstrecke unter 10 mm gilt als pathologisch (PERRY, 2008). Um die basale Tränenproduktion allein zu bestimmen, haben GELATT et al. (1975) eine Modifikation des STT eingeführt, den Schirmer-Tränen-Test II. Dabei wird das Auge vor der Untersuchung anästhesiert, der Bindehautsack getrocknet und anschließend der Teststreifen eingelegt. Der Wert beträgt beim Hund durchschnittlich 11,6 mm/Min (GELATT, 2007; BERGER u. KING, 1998; HAMOR et al., 2000).

Tabelle 5: Mögliche Einflussfaktoren auf das Ergebnis des Schirmer-Tränen-Tests

Ursache	Auswirkung	Autor
Verschiedene Teststreifen	Unterschiedliche Materialien oder Skalierungen beeinflussen das Fließverhalten.	HAWKINS u. MURPHY (1986) HIRSH u. KASWAN (1995) VAN DER WOERDT u. ADAMCAK (2000)
Umgang mit dem Streifen mit bloßen Fingern	Hautlipide oder Salze beeinflussen die Fließgeschwindigkeit.	HARKER (1970)
Schleim im Auge	Behindert die Fließgeschwindigkeit.	SPIESS (1998)
Geschlecht	Hündinnen haben niedrigere STT I-Werte als Rüden.	KASWAN et al. (1991) BERGER u. KING (1998) BARNETT (1980)
Alter	Sinkende STT I-Werte bei älteren Tieren.	KASWAN et al. (1991) BERGER u. KING (1998) HARTLEY et al. (2006)
Gewicht	Tiere mit niedrigerem Gewicht zeigen geringere STT I-Werte.	BERGER u. KING (1998)
Rasse	Langhaardackel, Cavalier King Charles Spaniel und WHWT zeigen häufiger erniedrigte STT I-Werte.	KASWAN et al. (1991)
Tageszeit	Schwankungen im Verlauf des Tages, aber auch zwischen den Tagen. Niedrigste Werte wurden am Mittag und höchste Werte am Nachmittag gemessen.	HARTLEY et al. (2006)
Medikamente	<ul style="list-style-type: none"> ◦Atropin hemmt die Tränensekretion bis zu 5 Wochen lang. ◦Sulfonamide wirken sich auf den STT aus. ◦Etodolac wirkt sich auf den STT aus. 	HOLLINGSWORTH et al. (1992) COLLINS et al. (1986) KLAUSS et al. (2007)
Entfernung der Nickhautdrüse	STT I-Werte sinken. (Die Werte vermindern sich um 29-57% je nach Autor) SAITO et al. fanden eine Verminderung des STT II um 37% nach 2 Wochen.	GELATT (2007) HELPER (1996) SAITO et al. (2001)
Narkose /Sedation	Fehlender Lidschluß. Medetomidin/Butorphanol wirken sich negativ auf das Ergebnis des STT aus.	SANCHEZ et al. (2006)
Diabetes mellitus Hypothyreoidismus Hyperadrenocortizismus	STT I-Werte sind bei erkrankten Tieren niedriger als bei gesunden Hunden	WILLIAMS et al. (2007)
Jungtier	Welpen zwischen 22 und 28 Tagen alt, zeigen reduzierte STT I -Werte von 13mm/Min	DA SILVA u. GALERA (2004)

Abk: mm/Min= Millimeter/Minute, STT= Schirmer-Tränen-Test, WHWT= West Highland White Terrier

2.3.1.2 Phenolrot-Faden-Test (PRT)

Eine weitere Methode zur Überprüfung der Tränendrüsenfunktion ist der Phenolrot-Faden-Test. Hierbei handelt es sich um einen mit dem pH-Indikator Phenolrot imprägnierten Baumwollfaden mit einem Durchmesser von ca. 0,3mm und vorgefertigtem Falz. Das

Einhängen in den Konjunktivalsack erfolgt analog zum Schirmer-Streifen. Die Messdauer beträgt allerdings nur 15 Sekunden. Danach wird der Faden wieder entfernt und die Länge des verfärbten Anteils mit einem Maßstab gemessen und in mm/15 Sekunden ausgedrückt (BROWN et al., 1996). Der gelbe Faden, der mit der alkalischen Tränenflüssigkeit in Kontakt kommt, verfärbt sich rot und kann so leicht abgelesen werden. Vorteile beim PRT gegenüber dem STT ergeben sich durch die kürzere Messdauer, den geringeren Fremdkörperreiz und die geringere Irritation okulärer Strukturen (BROWN et al., 1996). Er eignet sich vor allem bei kleineren Tieren. Normale Werte liegen beim Mensch zwischen 9 und 18mm/15 Sekunden (LABETOULLE et al., 2002) und beim Hund im Bereich von $34,15 \pm 4,45$ mm/15 Sekunden (CARTER u. COLITZ, 2002).

2.3.1.3 Tear Film Break Up Time (TFBUT)

Die Messung der Aufreißzeit ist eine indirekte Messung der Tränenfilmstabilität und kann Hinweise auf eine qualitative Tränenabnormalität geben (GELATT, 2007). Die TFBUT ist definiert als das Intervall zwischen dem letzten vollständigem Lidschlag und dem Auftreten des ersten Tränenfilmdefektes auf der Hornhaut. Zur Durchführung wird die Tränenflüssigkeit mit Fluoreszein angefärbt und durch den folgenden Lidschlag auf der Oberfläche verteilt. Die Lider müssen nun manuell offen gehalten werden, bis es zu den ersten „dry spots“ kommt, die sich als schwarze Flecken im Fluoreszein darstellen (GELATT, 2007). Die Dauer bis es zum Auftreten von Aufreißzonen kommt, hängt von der Oberflächenspannung, der Viskosität des Tränenfilms und dem Zustand der epithelialen Oberfläche ab. Es handelt sich um einen sehr anfälligen Parameter, der auch von der Konzentration der Fluoreszeinlösung beeinflusst wird. Ein weiteres Problem stellt beim Hund das zusätzliche Blinzeln mit der Nickhaut dar (eigene Feststellung). Beim Mensch beträgt die TFBUT im Normalfall 20-30 Sekunden, Werte unter 10 Sekunden zeigen Instabilitäten an (LEMP u. BLACKMAN, 1981). Beim Hund beträgt die TFBUT etwa 20 Sekunden (SAITO et al., 2001). Des Weiteren ist es möglich anhand des Tearscope® eine nichtinvasive (ohne die Instillation von Fluoreszein) Messung der TFBUT (NIBUT) durchzuführen (NICHOLS et al., 2002). Das Meßprinzip des Tearscope-Gerätes beruht auf der Interferometrie. Es wird die Zeit gemessen, zwischen dem letzten Lidschlag und dem Aufriss eines reflektierten Bildes auf dem Tränenfilm. Über eine morphologische Charakterisierung der Interferenzmuster sind Aussagen über die Qualität des Tränenfilms möglich, zusätzlich lässt sich der Schweregrad des trockenen Auges über eine Farbskala der

Interferenzen beurteilen (NICHOLS et al., 2002). CARRINGTON et al. (1987) untersuchten 16 an KCS erkrankte Hunde anhand der Biomikroskopie mit polarisiertem Licht. Die Tränenauflösezeit konnte damit gut bestimmt werden, so dass bessere Informationen zur Dicke der Lipidschicht und insgesamt zur Stabilität des Tränenfilms gewonnen werden konnten. Die Dicke der Lipidschicht schwankte bei den an KCS erkrankten Hunden zwischen 0,089 und 0,581 pro μm . Auch der Therapieverlauf bei KCS-Patienten konnte damit gut beurteilt werden. Bei der nicht-invasiv gemessene Break-up Time (NIBUT) ist die Auflösezeit länger, da der Lipidfilm nicht durch den Farbstoff destabilisiert wird. Die Dauer ist beim Mensch in der Regel länger als 20 Sekunden (MENGHER et al., 1985) und liegt in der Größenordnung von 20-25 Sekunden.

2.3.2 Vitalfärbungen

Vitalfärbungen von Kornea und Konjunktiva mit Bengalrosa, Lissamingrün sowie Fluoreszein sind objektive Tests zur Analyse eines Oberflächenschadens des trockenen Auges (GELATT et al., 2006).

2.3.2.1 Fluoreszein

Fluoreszein ist ein wasserlöslicher Farbstoff, der durch seine Lipidunlöslichkeit intaktes Korneaepithel nicht penetrieren kann und sich nicht an intaktes Korneaepithel anlagert. (FEENSTRA u. TSENG, 1992). Die Anfärbung der Bindehaut und Hornhaut wird mit 0,5 bis 2%iger unkonservierter Fluoreszeinlösung oder einem mit Kochsalzlösung angefeuchteten, mit Fluoreszein imprägnierten Papierstreifen durchgeführt. Nach 20-30 Sekunden der Instillation wird das Auge mit steriler Natrium-Chlorid-Lösung vorsichtig ausgespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wird die verbleibende Färbung beurteilt. Epithelerosionen oder Ulzera, die das hydrophile Stroma freilegen, erlauben die Penetration des Farbstoffes und führen zu einer Grünfärbung der Defekte. Die zusätzliche Beurteilung mit Biomikroskop und Blaufilter ist empfehlenswert, um kleinere Korneadefekte sichtbar zu machen (GELATT et al., 2006).

2.3.2.2 Bengalrosa/Lissamingrün

Lange war man davon ausgegangen, dass Bengalrosa (1%) und Lissamingrün (1%) degenerierte Zellen und Schleim anfärben (NORN, 1969).

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Bengalrosa nicht nur abgestorbene Epithelzellen von Hornhaut und Bindehaut anfärbt, sondern auch Oberflächenzellen mit defekter Glykokalyx darstellt (FEENSTRA u. TSENG, 1992) und in intakte Zellen eindringt und diese anfärbt (MANNING et al., 1995; KIM u. FOULKS, 1999). Muzine und Albumine des Tränenfilms verhindern im Normalfall, dass Bengalrosa die Epithelzellen erreicht. Aus diesem Grunde weist Bengalrosa, wenn es Epithelzellen anfärbt, auch Defekte des Tränenfilms, speziell der Muzinschicht nach. Bengalrosa hat sich als zytotoxisch erwiesen. Die Zytotoxizität wird durch Wechselwirkung mit Licht zusätzlich gesteigert (KIM u. FOULKS, 1999). Beim Probanden ruft Bengalrosa fast immer Beschwerden hervor und kann den Lidrand anfärben. Im schlimmsten Fall kann es zu einem mehrere Stunden anhaltendem Blepharospasmus kommen (KIM u. FOULKS, 1999).

Lissamingrün ist ein gut verträglicher Vitalfarbstoff, der abgestorbene Epithelzellen der Hornhaut und Bindehaut nachweist. Er verursacht im Gegensatz zu Bengalrosa kaum Irritationen der Augenoberfläche und färbt gesunde Hornhautzellen nicht an. Die Färbecharakteristika von Lissamingrün und Bengalrosa entsprechen einander weitgehend. KIM u. FOULKS (1999) empfehlen aufgrund der Zelltoxizität von Bengalrosa für die Diagnostik an der Augenoberfläche den Farbstoff Lissamingrün.

2.3.3 Weiterführende Untersuchungen

Neben den Standarduntersuchungen für den Tränenfilm, gibt es zusätzliche Untersuchungen für die einzelnen Tränenfilmbestandteile, die einer steten Entwicklung unterliegen.

2.3.3.1 Meibometrie

Die Meibometrie erlaubt eine Bestimmung der Lipidmenge am Lidrand. Proben von Meibom Sekret werden mit Hilfe eines synthetischen Streifens vom Lidrand gewonnen und durch die Veränderung der optischen Dichte des Streifens quantifiziert (CHEW et al., 1993). CHEW et al. (1993) fanden beim gesunden, erwachsenen Mann etwa 300µg Lipide am Lidrand und schätzen die Menge der Lipide im Tränenfilm auf 9µg. OFRI et al. (2007b) ermittelten mit Hilfe des Meibometers eine mittlere Meibom Sekret-Menge von 179± 60 Meibometer Einheiten (MU) beim Hund. Sie fanden keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern oder eine Beziehung zwischen Alter und Lipidmenge, allerdings Unterschiede zwischen den Rassen. Der Zwergschnauzer zeigte signifikant weniger Lipid am Lidrand. BENZ et al. (2008) fanden bei der Untersuchung von 10 Hunden an 10 Tagen mittlerer Werte von 211± 48 MU. Signifikante Unterschiede zwischen den Augen zeigten sich nicht, allerdings

signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Untersuchern und eine große Schwankung der gemessenen Werte.

Beim Mensch finden sich mittlere Lipidgehalte von 141 MU (CHEW et al., 1993). Mit Hilfe eines Umrechnungsfaktor (CHEW et al., 1993) können die gemessenen Einheiten in die Lidrandfläche umgerechnet werden. Benutzt man diesen Umrechnungsfaktor, beträgt der mittlere Gehalt von Meibom-Lipid am Lidrand des Hundes $2,98\mu\text{g}/\text{mm}^2$. Beim Mensch ist die Menge des Sekretes abhängig von Alter und Geschlecht. Sie ist niedrig bei Kindern und steigt mit dem Alter an (CHEW et al., 1993). Der Lipidgehalt ist bei Männern höher als bei Frauen. Diese Unterschiede werden der Höhe des Androgen-Spiegels zugeschrieben, welcher die Talgdrüsenproduktion kontrolliert. Der beim Hund im Vergleich zum Mensch höhere Lipidgehalt, könnte die niedrigere Lidschlagfrequenz bei der Spezies Hund erklären (OFRI et al., 2007b).

2.3.3.2 Osmolarität

Die Bestimmung der Osmolarität der Tränenflüssigkeit bei der Diagnose des Trockenen Auges ist ein Verfahren, dessen Anwendung verschiedene Vorzüge hat. Die Bestimmung eines direkt am Mechanismus des Trockenen Auges beteiligten Parameters ist von beträchtlichem Wert (MESSMER, 2007). Beim Mensch, Rind und Kaninchen ist die Elektrolytkonzentration von Tränen und Serum vergleichbar. Nur Kalium hat in den Tränen eine bis zu sechsfach höhere Konzentration, was auf einen aktiven Transportmechanismus hinweist (MIRCHEFF, 1989). Beim Mensch sind Konzentrationen von Natrium (120-170mmol/l) und Bikarbonat (26mmol/l) beschrieben, die denen vom Serum entsprechen. Die Kaliumkonzentration ist im Vergleich zum Serum fünffach erhöht (6-42mmol/l) und auch Magnesium (0,3-1,1mmol/l), Zink (50-100 $\mu\text{mol}/\text{l}$) und Mangan (0,2-0,9 $\mu\text{mol}/\text{l}$) sind in ihrer Konzentration erhöht. Der Chlorid- (106-135mmol/l) und der Kalziumgehalt (0,3-2,0mmol/l) sind dagegen im Vergleich zum Serum erniedrigt (MIRCHEFF, 1994). Eng mit der Elektrolytkonzentration verknüpft ist die Osmolarität des Tränenfilms, welche beim Mensch normalerweise im hypertonen Bereich bei zirka 316mOsm/l liegt. Eine erhöhte Tränenosmolarität deutet auf eine Imbalance zwischen Tränenproduktion und Tränenverdunstung hin. Beim trockenen Auge ist dieser Wert auf bis zu 340mOsm/l erhöht (MESSMER, 2007). Die Hyperosmolarität stimuliert eine Kaskade entzündlicher Ereignisse in den Oberflächenzellen von Hornhaut und Bindehaut und führt zu einem Untergang von Becherzellen, wodurch es zu einem instabilen Tränenfilm infolge einer Reduktion des Muzins

MUC5AC kommt. Die Osmolarität des Tränenfilms korreliert eindeutig mit der Bengalrosafärbung der Augenoberfläche (MESSMER, 2007). Die Osmolarität wird mit einem sog. Osmometer bestimmt. Als Messprinzip dient die Messung der Gefrierpunkts-erniedrigung. Die Gewinnung des Tränenfilms ist entscheidend für die Messung sinnvoller Osmolaritäten. Dies kann nur aus dem basalen Tränenfilm, nicht aus Reflextränen erfolgen. Auch eine Materialgewinnung aus dem unteren Fornix verfälscht das Ergebnis, da die Osmolarität dort um 5,2% niedriger liegt als im Tränenmeniskus. Die Verdunstung der Probe kann zu falsch erhöhten Messwerten führen (MESSMER, 2007). Bislang erfolgten diese Untersuchungen im Labor, aber die Entwicklung neuer Osmometer (z. B. Tearlab®), die nur geringste Tränenmengen (ca. 0,2µl) benötigen und die Osmolarität semiautomatisch bestimmen, könnte dies deutlich verbessern. Die Messung der Osmolarität des Tränenfilms könnte in der Zukunft ein wichtiger Test in der Diagnose des trockenen Auges beim Mensch werden (MESSMER, 2007). Sie war als einzelner Test sowohl der Lactatbestimmung, dem STT, als auch der Anfärbung der Augenoberfläche mit Bengalrosa überlegen (MESSMER, 2007).

Die Untersuchung von KORTH et al. (2009) an 76 gesunden Hunden zeigte, dass 70 der Hunde in einem Bereich von 303 bis 400 mOsm/l mit einem mittleren Wert von 355,5 mOsm/l lagen. Zudem stellten KORTH et al. (2009) weite Schwankungen im Laufe eines Tages fest und vermuten daher, dass die Osmolarität des Tränenfilms beim Hund weniger uniform ist als beim Mensch. Das Tearlab®, welches Osmolaritäten im Bereich von 275-400 mOsm/l misst, stößt dabei an seine Grenzen.

2.3.3.3 Impressionszytologie

Bei der Impressionszytologie handelt es sich um ein einfaches, nichtinvasives zytologisches Verfahren, um die Becherzellichte zu bestimmen. Die Proben werden mit Hilfe eines Filterstreifens von der superioren, temporalen bulbären Konjunktiva nahe des Limbus entnommen. Die Träger werden nach Entnahme der Proben durch 95%igen Alkohol fixiert und mit Perjod-Schiff-Reagenz gefärbt. Die Becherzellen färben sich stark dunkelrosa bis violett an, die Zellkerne degenerierter oder keratinisierter Zellen zeigen sich im Vergleich zur normalen Epithelzelle blasser. In fortgeschrittenen Stadien der KCS findet sich S-förmig kondensiertes Chromatin in den Kernen, sog. Snakes (BOLZAN et al., 2005).

Die Becherzellichte in der Bindehaut ist von der Lokalisation abhängig. MOORE et al. (1987) empfehlen für eine Untersuchung der Becherzellen am lebenden Tier eine

Entnahme im unteren konjunktivalen Fornix, Impressionszytologien an der Konjunktiva des Bulbus scheinen ihnen ungeeignet, da dort physiologisch wenig Becherzellen vorhanden sind. Keratopathien bedingt durch ein Muzindefizit sind charakterisiert durch ein Becherzell- zu Epithelzell-Verhältnis von unter 0,05 beim Hund und 0,08 bei der Katze (MOORE et al., 1987). BOLZAN et al. (2005) führten Impressionszytologien an der oberen temporalen Konjunktiva des Bulbus bei 20 gesunden Hunden durch. Sie fanden bei der mikroskopischen Untersuchung Epithelzellen aus unterschiedlichen konjunktivalen Schichten sowie Becherzellen und Leukozyten. Superfizial- und Intermediärzellen waren vorherrschend. Immer gefunden wurden auch keratinisierte Epithelzellen, Zelldebris und Schleim. Melaninhaltige Granula befanden sich teilweise in den Superfizial- und den Intermediärzellen. BOLZAN et al. (2005) halten die Impressionszytologie für ein brauchbares Hilfsmittel und eine wertvolle Ergänzung bei der Diagnostik von konjunktivalen Veränderungen.

2.3.3.4 Tränenproteinanalyse

Die Tränenproteine sind essentiell für eine physiologische Funktion des Tränenfilms. GRUS et al. (2001) untersuchten die Unterschiede im Proteinmuster mit Hilfe elektrophoretischer Trennung und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und konnten anhand der unterschiedlichen Proteinverteilungen Unterschiede zwischen KCS-Patienten und gesunden Probanden darstellen. Durch ELISA zeigten OHASHI et al. (2006), dass Tränen von Patienten mit trockenen Augen eine veränderte Proteinzusammensetzung aufweisen. Während Lactoferrin, Lysozym und epidermaler Wachstumsfaktor erniedrigt waren, war Aquaporin 5 erhöht. Aufgrund der höheren Zuverlässigkeit und besseren Automatisierbarkeit wird die Untersuchung der Tränenproteinmuster nun mit Massenspektrometern wie SELDI-TOF (GRUS et al., 2005) und MALDI-TOF durchgeführt.

2.4 Immunologie der Augenoberfläche und der sekretorischen Anteile des Tränenapparates

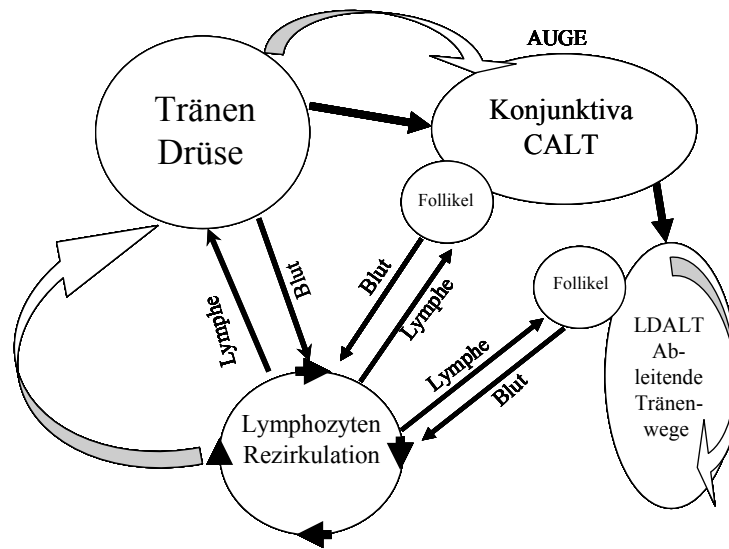


Abbildung 3: Konzept des Augen-assoziierten lymphatischen Gewebes (EALT)

Das lymphatische Gewebe an der Augenoberfläche und der Adnexe ist anatomisch kontinuierlich von der Tränen drüse über ihre Ausführungsgänge in die Konjunktiva (als CALT) und über den Tränenpunkt in die ableitenden Tränenwege (als LDALT) bis zur Nase verbunden. Quelle: KNOP u. KNOP (2003)

Abk: EALT= Eye-Associated Lymphoid Tissue, CALT= Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue, LDALT= Lacrimal Drainage-Associated Lymphoid Tissue

Das Auge besitzt neben den mechanischen Abwehrmöglichkeiten durch die knöchernen Orbita und die Augenlider mit den Wimpern zusätzlich ein unspezifisches chemisches Abwehrsystem durch antibakteriell aktive Peptide und Proteine, die in Tränen drüse und Konjunktiva selbst produziert werden. Daneben gibt es noch ein unspezifisches zelluläres Abwehrsystem durch Phagozytose und ein spezifisches Immunsystem (KNOP u. KNOP 2005; DAVIDSON u. KUONEN, 2004). Das Immunsystem des Auges nutzt eine effektive, aber komplexe Serie miteinander verknüpfter Mechanismen, um eine mikrobielle Invasion zu verhindern (GILGER, 2008). Okuläres Muzin verhindert eine bakterielle Kolonisation und hilft Fremdmaterial zu entfernen (HICKS et al., 1997). Das korneale Epithel dient als Barriere, da es interzelluläre *tight-junctions* besitzt und durch die häufige Erneuerung der oberflächlichen Zellen werden möglicherweise befallene Zellen regelmäßig abgestoßen (GILGER, 2008). Tränen drüse, Konjunktiva und ableitenden Tränenwege des Menschen sind durch ein schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe kontinuierlich verbunden. Es

beginnt im periazinösen Bindegewebe der Tränendrüse, setzt sich entlang ihrer Ausführungsgänge in die Konjunktiva fort und zieht von dort über die Tränenpunkte kontinuierlich in die ableitenden Tränenwege bis zum Übergang in die Nase (KNOP u. KNOP, 2005). Neben der anatomischen Kontinuität des Gewebes werden die drei Organe durch den Fluss der Tränen verbunden, wodurch sie protektive Substanzen und den Einfluss gleichartiger Faktoren teilen. Dadurch wird die Immunabwehr von Tränendrüse, Konjunktiva und ableitenden Tränenwegen zwangsläufig zu einer funktionellen Einheit (GILGER, 2008). In der Konjunktiva und den ableitenden Tränenwegen kommen spezialisierte Gefäße in Form von hochendothelialen Venulen vor, die für eine regulierte organspezifische Wanderung lymphatischer Zellen wichtig sind (Rezirkulation) (GILGER, 2008). Das augenassoziierte lymphatische Gewebe ist so an die anderen Organe des Schleimhautimmunsystems des Körpers (MALT) angeschlossen und ist durch die Produktion von sekretorischem IgA in allen drei Organen auch ein Teil des sekretorischen Immunsystems. Die Tränendrüse, das CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) und das LDALT (lacrimal drainage-associated lymphoid tissue) bilden eine funktionelle immunologische Gruppe, einen Baustein des MALT, genannt das EALT (eye-associated lymphoid tissue) (KNOP u. KNOP, 2001). EALT wird in zwei Formen unterteilt. Ein organisiertes Lymphgewebe, bei dem Lymphozyten in Follikeln organisiert sind und ein umfangreiches diffuses lymphoides Gewebe. In den Lymphfollikeln wird Antigen von der Umgebung durch follikel-assoziiertes Epithel aufgenommen und durch antigen-präsentierende Zellen naiven Lymphozyten präsentiert. Dies führt zur Aktivierung, Proliferation der Lymphozyten und unter Umständen zu einer Differenzierung in Effektorzellen (B- oder T-Zellen). Diese aktivierten Lymphozyten verlassen die Follikel und wandern durch Lymphgefäße oder den Blutstrom zu den Effektororganen, der Tränendrüse und der Konjunktiva (KNOP u. KNOP, 2005). MALT dient neben der Erkennung und Abwehr von Antigenen auch der Erzeugung einer Immuntoleranz gegen nicht pathogene Antigene, um unnötige Entzündungen zu vermeiden (KNOP u. KNOP, 2005; GILGER, 2008). Dies geschieht auch durch Toll-like Rezeptoren (TLR). Toll-like Rezeptoren sind Strukturen des angeborenen Abwehrsystems und befinden sich auf dendritischen Zellen, Neutrophilen und Makrophagen (CHANG et al., 2006). Sie dienen der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekulare Muster (PAMPs). Dabei handelt es sich um Strukturen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen. Die Antwort von TLRs auf PAMP-Kontakt ist abhängig vom spezifischen Rezeptor. Es kann zu Phagozytose von Mikroben, der Produktion von reaktiven Nitrogen- und

Oxygenverbindungen oder entzündlichen Zytokinen und der Expression von costimulierenden Molekülen kommen. Durch die TLR vermag das angeborene Abwehrsystem zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ zu unterscheiden (CHANG et al., 2006). TLRs sind vor allem intrazellulär und am basalen Epithel platziert. Durch diesen Mangel von TLRs an der epithelialen Oberfläche, kommt es zu einer selteneren Antigenpräsentation, wodurch weniger Immunantwort ausgelöst wird. Diese Hemmung der Präsentation von Antigenen wird Ignoranz genannt und verhindert unnötige Reaktionen (KINOSHITA u. UETA, 2010). Die Zellen des lymphatischen Gewebes sind eine wichtige Quelle löslicher Immunmodulatoren (Zytokine) (GILGER, 2008). Wird die Toleranz oder Ignoranz durch Schäden am oberflächlichen Epithel oder sinkende IgA-Gehalte gestört, werden entzündliche Zytokine produziert, wodurch Antigenen ein unkontrollierter Zugang zum Immunsystem ermöglicht wird, die zu einer chronischen Entzündung führen können (GILGER, 2008).

2.4.1 Immunmechanismen im Bereich der Tränendrüse

Die Tränendrüse spielt eine entscheidende Rolle im immunologischen Schutz der Augenoberfläche. Sie gilt als Hauptquelle des IgA im Tränenfilm (KNOP u. KNOP, 2005). Die wichtige Rolle von IgA wird besonders nachts deutlich, zu dieser Zeit stellt IgA fast 80% des totalen Tränenproteingehaltes beim Mensch (ZIERHUT et al., 2002). KNOP u. KNOP (2005) konnten in der Tränendrüse des Menschen zwischen den Epithelzellen der sekretorischen Drüsenendstücke (Azini) im lockeren Bindegewebe der Lamina propria diffus verteilte Lymphozyten und Plasmazellen darstellen. IgA konnte immunhistologisch in den Plasmazellen, im Epithel und im Lumen der Drüsenendstücke nachgewiesen werden (KNOP u. KNOP, 2005). Das Epithel der Endstücke war stark positiv für die sekretorische Komponente von IgA. Gelegentlich wurden auch Mastzellen und einzelne segmentkernige Granulozyten beobachtet (KNOP u. KNOP, 2005). Die Tränendrüse enthält dendritische Zellen und Makrophagen (ZIERHUT et al., 2002). Obwohl es in der Tränendrüse keine hochendothelialen Venulen gibt, ist sie offenbar über flachendotheliale Gefäße an die regulierte Wanderung lymphatischer Zellen angeschlossen, da sie IgA-positive Plasmazellen enthält (ZIERHUT et al., 2002). Die Epithelzellen der Tränendrüse synthetisieren und sezernieren zahlreiche Proteine, die Funktionen in der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr am Auge übernehmen (GILGER, 2008).

2.4.2 Immunmechanismen im Bereich des Tränenfilms

Die ständige Erneuerung des Tränenfilms verhindert die Anheftung von Bakterien und Viren. Speziell die Muzine unterstützen dieses mechanische Reinigungssystem, wodurch sie zu einer spezifischen biochemischen und immunologischen Abwehrbarriere beitragen (DAVIDSON u. KUONEN, 2004). Muzine verhindern die Anlagerung von Bakterien, indem sie diese binden, einhüllen und den ableitenden Tränenwegen zuführen. In dieser Art werden auch Zelldebris und Fremdkörper von der Augenoberfläche entfernt (HICKS et al., 1997). Okuläres Muzin ist reich an Sialinsäure (CARRINGTON et al., 1993, CORFIELD et al. 2005, ROYLE et al. 2008). Viele okuläre Pathogene (wie Adenoviren, Influenzaviren und Pseudomonaden) nutzen Sialinsäuren als zelluläre Rezeptoren und so kann die Sialinsäure als Angriffspunkt für diese Pathogene fungieren (ROYLE et al., 2008). Sialinsäure kann die Leukozytenbewegung beeinflussen, indem sie an Selectin und weitere Zelloberflächen-Rezeptoren bindet. ROYLE et al. (2008) konnten in den Tränen bei geschlossenen Augen einen höheren Sialoglykoproteingehalt nachweisen. Die Glykosylierung des okulären Muzins scheint ein Faktor in der Unterscheidung zwischen okulärem Pathogen und Kommensale zu sein. Während *Moraxella* beim Mensch pathogen ist, gehört es bei Hund und Kaninchen zur normalen Flora (URBAN et al. 1972; ROYLE et al., 2008). Die Muzinproduktion und Sekretion wird durch Zytokine von dendritischen Zellen der entzündeten Konjunktiva stimuliert, wie Interleukin-6 und γ -Interferon (BERRY et al., 2000), ebenso wie durch Bakterien stimulierte Toll-like Rezeptoren, welche die Muzin-Gen-Transkription induzieren können (CHANG et al., 2006). Die Epithelzellen von Konjunktiva, Tränensack und nasolakrimaler Oberfläche produzieren mehrere antimikrobielle Peptide, um das Auge vor einer Invasion mit Mikroorganismen zu schützen. Dazu gehören unter anderem Lysozym, Lactoferrin, Lipocalin, Angiogenin und die sekretorische Phospholipase A2 (PAULSEN et al., 2002).

2.4.3 Immunmechanismen im Bereich der Kornea

Die Kornea besitzt antigen-präsentierende Zellen (APC). Bislang ging man allerdings davon aus, dass sie sich hauptsächlich am Limbus befinden und bei Bedarf in die zentrale Kornea rekrutiert werden können (HAMRAH et al., 2003; DANA, 2004). HAMRAH et al. (2003) zeigten auch in der zentralen Kornea eine heterogene Gruppe von epithelialen und stromalen Dendritischen Zellen (DC), welche als APC funktionieren. Dazu kommen Makrophagen, die von HENDRICKS et al. (1992) im normalen Stroma der Kornea von Mäusen nachgewiesen

wurden. Die APC finden sich vermehrt in der peripheren Kornea. Die Dichte dieser Zellen nimmt vom Limbus zum Zentrum hin ab (HAMRAH et al., 2003). Die Zellen im Zentrum sind in einem einzigartigen immaturren Zustand. Sie sind MHC Klasse II negativ, können aus der Kornea migrieren, costimulatorische Moleküle expressieren und T-Zellen stimulieren (DANA, 2004). Infektion oder Entzündung stimulieren die Freisetzung verschiedener Chemokine, welche die Rekrutierung von APC vom Limbus in die Kornea fördern (DANA, 2004). Unter anderem Interleukin-1, ein proinflammatorisches Zytokin, welches von der Kornea besonders stark bei Entzündung produziert wird, führt zu einer gesteigerten Expression von Interzellulärem Adhäsions Molekül-1 durch das limbale vaskuläre Endothelium, was der Rekrutierung von Leukozyten in die periphere Kornea vorausgeht (DANA, 2004). Über die Faktoren, die bei DC zur Reifung führen ist bislang wenig bekannt. Es wird vermutet das Faktoren wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Zytokine wie der Transforming growth factor- β und IL-10 in der Regulation der DC Reifung eine Rolle spielen. DC selbst sind wichtige Produzenten von Typ-1-Interferonen, TNF- α und IL-1 β , welche autokrin die DC Aktivierung und Reifung fördern (HAMRAH et al., 2003). Das korneale Epithelium produziert geringe Mengen von PGE₂ (SNYDER et al., 1982), weshalb HAMRAH et al. (2003) vermuten, dass die Kornea in die Regulation der Immunität involviert ist, indem sie die Reifung der vorhandenen DC aktiv unterdrücken kann. Obwohl die DCs in der zentralen Kornea von Nager und Mensch auf ihren Oberflächen Moleküle zeigen, die sie klar als Teil der dendritischen Zellen ausweisen, expressieren sie keine Moleküle, die T-Zellen stimulieren und bleiben in der zentralen Kornea in einem immaturren Stadium (YAMAGAMI et al., 2005). Studien an Mäusen, Menschen und Hunden zeigten, dass Leukozyten und CD45⁺ Zellen in der normalen, gesunden Kornea auch im Zentrum vorkommen (CARVALHO et al., 2009). Langerhans Zellen, welche MHC Klasse II exprimieren und fähig sind Antigene für Lymphozyten zu präsentieren, wurden im kornealen Limbus und dem konjunktivalen Epithelium verschiedener Spezies gefunden (WILLIAMS, 2005b). WILLIAMS (2005b) konnte in der gesunden, nicht fixierten caninen Kornea MHC Klasse II Expression im Epithelium nachweisen, sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie.

2.4.4 Immunmechanismen im Bereich der Konjunktiva

In der humanen Konjunktiva und dem lakrimalen Drainagesystem wurde ein assoziiertes Lymphgewebe welches alle Komponenten für eine komplette Immunantwort enthält nachgewiesen (KNOP u. KNOP, 2005). KNOP u. KNOP (2005) beschreiben es als CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue). Die lymphatischen Zellen lagen vor allem in

der lockeren Lamina propria, wodurch der Eindruck einer lymphatischen Schicht entstand. Diese lymphatische Schicht ließ sich kontinuierlich entlang der Konjunktiva verfolgen (KNOP u. KNOP, 2005). Das CALT ist stark in der tarso-orbitalen Konjunktiva ausgeprägt, wo auch eine bevorzugte Ablagerung von Fremdstoffen beschrieben ist. Grundsätzlich hatte das lymphatische Gewebe sowohl für den diffusen Typ wie auch für die Lymphfollikel eine deutliche Häufung im Bereich der palpebralen Konjunktiva. Die Hauptmasse befand sich in einem Bereich, der kongruent mit der Position der Kornea bei Lidschluß ist. In der Konjunktiva und in den ableitenden Tränenwegen kommen regelmäßig Lymphfollikel vor, die die Funktion haben Antigene zu erkennen und entsprechende Effektorzellen (v.a. Plasmazellen) zu bilden (KNOP u. KNOP, 2005). Die Effektorzellen können zusätzlich in die Tränendrüse einwandern, wo vermutlich die Hauptmasse der protektiven Immunglobuline produziert wird. Im Epithel und der Lamina propria befinden sich überwiegend CD8-positive Suppressor-T-Zellen. In der Lamina propria finden sich auch T-Helfer-Zellen. Da T-Suppressorzellen in der Konjunktiva überwiegen, wird angenommen, dass hier Immunreaktionen eher unterdrückt werden (KNOP u. KNOP, 2005). KNOP u. KNOP (2005) konnten zeigen, dass die Konjunktiva und die ableitenden Tränenwege ebenfalls Komponenten des sekretorischen Immunsystems enthalten und dort lokal sekretorisches Immunglobulin A produziert wird. GIULIANO et al. (2002) konnten Zellen in der Nickhaut des Hundes nachweisen, die die Kennzeichen von M-Zellen erfüllen. M-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen, die sowohl feste als auch lösliche Antigene auf der Schleimhautoberfläche sammeln und sie zum umgebenden Lymphgewebe bringen. Sie zeichnen sich durch eine gering ausdifferenzierte Oberfläche mit kleinen Mikrovilli und Mikrofalten im Vergleich zu den Oberflächen der anderen Epithelzellen aus. Zusätzlich besitzen sie eine eingestülpte basolaterale Membran, die eine extrazelluläre Tasche für Lymphozyten und Makrophagen bildet. GIULIANO et al. (2002) dokumentierten auch Ansammlungen von B- und T-Zellen in den Lymphfollikeln der Nickhaut gesunder Hunde und unterstützen damit die Existenz eines organisierten MALT bei dieser Spezies. Experimentell in den Konjunktivalsack eingebrachte Bakterien lagerten sich selektiv an der apikalen Membran der M-Zellen an. GIULIANO et al. (2002) konnten nachweisen, dass die Bakterien von den Makrophagen in der Taschen der M-Zellen eingeschlossen wurden.

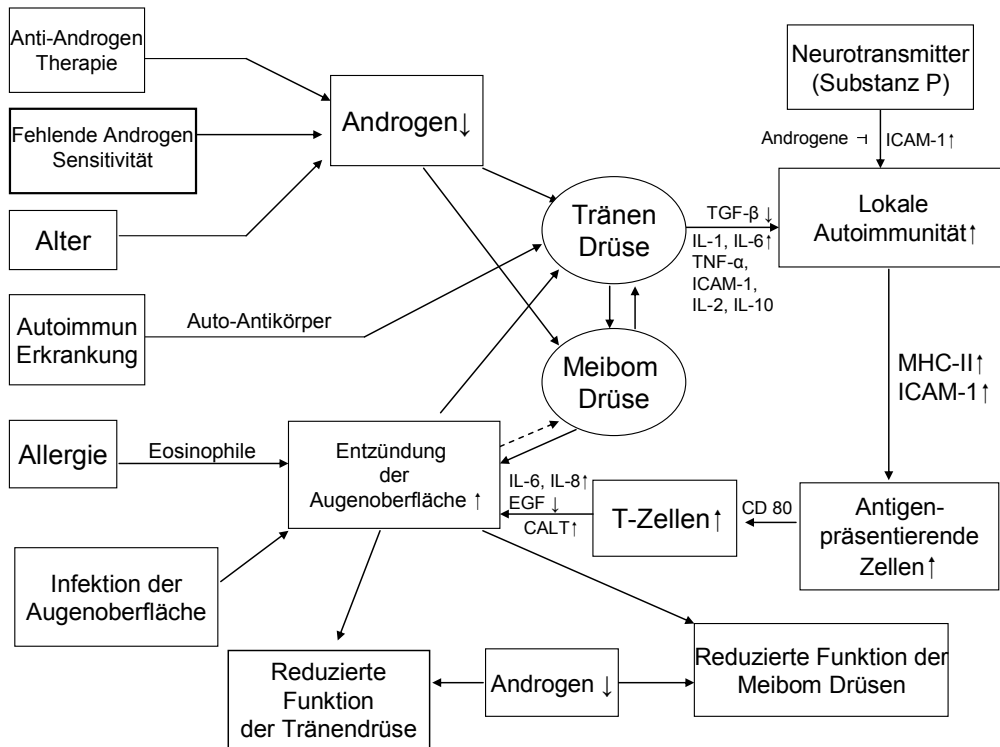


Abbildung 4: Die Tränen- und die Meibom Drüsen können durch verschiedene Störungen beeinflusst werden. Dies kann zu einer Stimulation der lokalen Autoimmunität führen, wodurch es zu einer Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen und nachfolgender T-Zell Infiltration kommt. Ergebnis ist eine Entzündung der Augenoberfläche und der Drüsengewebe mit reduzierter exokriner Funktion. Quelle: ZIERHUT et al. (2002).

Abk.: CALT= Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue, EGF= Epidermal Growth Factor, ICAM-1= Intercellular Adhesions Molecule-1, IL= Interleukin, PMN= Polymorpho-nucleare Leukocyten, TGF-β=Transforming Growth Factor-β, TNF-α= Tumor Necrosis Factor- α

Regulationsstörungen des Schleimhautimmunsystems können dazu führen, dass dieses eigentlich protektive Gewebe dann Entzündungsreaktionen unterstützt oder aufrechterhält, obwohl der zugrunde liegende Stimulus dies nicht rechtfertigt (ZIERHUT et al., 2002).

Die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf den Tränendrüsenepithelien kann durch Interferon-α oder TNF-α, die bei unspezifischen Entzündungen freigesetzt werden, angeregt werden. Eine initial unspezifische Entzündungsreaktion kann unter Umständen eine Gewebeerstörung und eine Freisetzung normalerweise immunologisch verborgener Antigene hervorrufen (ZIERHUT et al., 2002). Die molekulare Mimikry ist ein Mechanismus über den Viren die lymphatische Proliferation auslösen können. Virale Proteine, welche eine Immunreaktion auslösen, könnten gleichzeitig normale körpereigene Proteine

nachahmen. Es wird vermutet, dass Dacryoadenitiden, die durch kurzzeitige oder auch persistierende Infektionen der epithelialen Zellen mit einem Virus ausgelöst werden, auch die Expression von Autoantigenen verursachen (MIRCHEFF et al., 1994).

2.5 Innervation der Augenoberfläche und der Tränenorgane

Die Innervation des Bulbus und seiner Adnexe erfolgt durch die Gehirnnerven *N.opticus* (II), *N.oculomotorius* (III), *N.trochlearis* (IV), *N.trigeminus* (V), *N.abducens* (VI) und den *N.facialis* (VII) sowie Äste des sympathischen Nervensystems (NICKEL et al., 2003). Die sensible Versorgung des Auges und der Lider erfolgt durch die Äste des *N.trigeminus* (V), den *N.ophthalmicus* und den *N.maxillaris* (NICKEL et al., 2003). In der Orbita teilt sich der *N.ophthalmicus* in drei Äste: den *N.lacimalis*, den *N.frontalis* und den *N.nasociliaris*. Der *N.frontalis* versorgt das obere Augenlid, der *N.lacimalis* die Haut und die Bindehaut im Bereich des temporalen Augenwinkels und der *N.infratrochlearis* die Konjunktiva, die Nickhaut, die Tränenkarunkel und die Haut in der Gegend des nasalen Augenwinkels mit sensiblen Fasern, während die Haut des unteren Augenlids ihre sensiblen Fasern vom *N.zygomaticus* des *N.maxillaris* erhält. Diese verschiedenen Endzweige des *N.trigeminus* (V) bilden den afferenten Schenkel des Lidschluß- und Korneareflexbogens. Der efferente Schenkel verläuft über den *N.facialis* (VII) (NICKEL et al., 2003). Die Kornea ist eines der am stärksten innervierten Gewebe des Körpers und erhält dichte sensorische Innervation vom *N.trigeminus* (V) sowie sympathische Innervation vom oberen Zervikalganglion (NICKEL et al., 2003). Die Nervenversorgung übt wichtige neuromodulatorische Effekte auf die korneale Epithelphysiologie aus. Dazu gehören die Regulation des Ionentransportes, Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration sowie Wundheilung (MARFURT et al., 2001; KAFARNIK et al., 2008). Eine abnehmende Sensitivität führt zu einer verstärkten Epithelzellpermeabilität, sinkende Zellwanderung und Zellmitose und stellt damit einen Risikofaktor für wiederkehrende Erosionen und Infektionen dar. Zudem wird die Wundheilung vermindert (MARFURT et al., 2001). Die Innervation der caninen Kornea ist mit der von Mensch, Katze, Kaninchen und Ratte vergleichbar (MARFURT et al., 2001; KAFARNIK et al., 2008). Die Hornhautinnervation basiert auf zwei Ursprüngen. Die zentrale Region wird von einem stromalen Nervenplexus innerviert, der periphere Bereich wird von einem limbalen Nervenplexus versorgt. Der limbale Plexus besteht aus einem dichten, oberflächlichen Nerven-Netzwerk, welches als etwa 0,8-1,0mm Ringband in der peripheren

Kornea zu finden ist (MARFURT et al., 2001). Die Nerven des kornealen Stromas bestehen aus 14-18 oberflächliche Nervenbündel. Jedes dieser Bündel besteht aus 30-40 Axonen. Die Nerven des kornealen Stromas entlassen zahlreiche Äste und bilden verzweigte axonale Bäume (MARFURT et al., 2001). Die distalen Äste dieser Bäume anastomisieren intensiv miteinander und formen einen anatomisch komplexen stromalen Plexus, der sich ununterbrochen in alle Areale von Limbus zu Limbus ausbreitet. Dieser Plexus lässt sich unterteilen in eine posteriore und anteriore Ebene (MARFURT et al., 2001). KAFARNIK et al. (2007) beschreiben histologisch die Verteilung der kornealen Nerven gleichmäßig baumartig in allen Zellschichten der Kornea. Im kornealen Epithelium fanden sie freie Nervenenden. Im basalen epithelialen Nervenplexus verlaufen die Nervenfasern parallel und sind durch zahlreiche dünne Nervenfasern verbunden. Die Dicke der epithelialen Nervenfasern variiert zwischen 2 und 4µm (KAFARNIK et al., 2007). Dünne Nervenfasern bilden den im anterioren Stroma lokalisierten subepithelialen Nervenplexus innerhalb der netzförmigen Anordnung der stromalen Keratozyten. Die einzelnen Nervenfasern des subepithelialen Nervenplexus sind zwischen 3 und 6µm dick. Die stromalen Nerven verzweigen sich nach vorne y-förmig und setzen sich in die anteriore Ebene in Richtung des kornealen Epitheliums fort. Die Dicke der stromalen Nervenfasern variiert zwischen 8 und 50µm bei Hunden und Katzen (KAFARNIK et al., 2007). KAFARNIK et al. (2008) untersuchten die Verteilung der kornealen Nervenfasern mit Hilfe der in vivo konfokalen Mikroskopie (IVCM) beim Hund. Zudem wurde die Nervenfasern Dichte gemessen. Die totale Nervenfasern Dichte ist definiert als die Summe aller Nervenfasern und Äste pro Quadratmillimeter Korneagewebe. Auf die Schädelform bezogen zeigten brachycephale Rassen eine signifikant geringere korneale Innervation im Vergleich zu mesocephalen oder dolichocephalen Rassen (KAFARNIK et al., 2008). Die Nervenfasern Dicke von brachycephalen Hunden ist dabei nicht signifikant unterschiedlich zu mesocephalen Hunden (KAFARNIK et al., 2008). Bis jetzt sind 17 verschiedene Neurotransmitter an den kornealen Nervenfasern beschrieben worden (MUELLER et al., 2003). MARFURT et al. (2001) konnten zeigen, dass 99% der kornealen Nervenfasern beim Hund Calcitonin-Gene-Related-Peptide (CGRP) und Substanz P enthalten. 30% der Fasern enthalten Tyrosin-Hydroxylase. Das hohe Vorkommen dieser Neuropeptide in der caninen Kornea lässt vermuten, dass sie wichtige Funktionen bei der physiologischen Erneuerung und der Wundheilung erfüllen (MARFURT et al., 2001). Im Epithel, um die Blutgefäße und in den Meibom Drüsen wurden CGRP und Substanz P enthaltende Nervenfasern nachgewiesen (LUHTALA u. UUSITALO,

1991). Um die Becherzellen wurden muskarinerge und adrenerge Nervenendigungen sowie solche mit Vasoaktivem Intestinalen Peptid gefunden (DIEBOLD et al., 2001). Ein irritativer Stimulus der Augenoberfläche aktiviert die sensorischen Nervenenden und führt zu einer Freisetzung von Neuropeptiden. Diese stimulieren vermutlich die Becherzellsekretion durch parakrine Mechanismen (DARTT et al., 1995). BOTELHO et al. (1966) zeigten, dass der größte Anteil der strukturellen und funktionellen Innervation der Tränendrüse cholinerg erfolgt. EHINGER (1966) konnte auch adrenerge Nervenfasern in der Tränendrüse nachweisen, jedoch in geringerer Anzahl. Die Tränendrüse wird durch sympathische, parasymphatische und somatosensible Fasern innerviert. Der Anteil des Parasympathikus, gestellt durch Fasern des *N.intermediofacialis*, stimuliert die Sekretproduktion der Tränendrüse (NICKEL et al., 2003). Die sensible Innervation der Tränendrüse erfolgt durch den *N.lacrimalis*, welchem sich die parasymphatischen Fasern anlagern. Der Sympathikus wirkt hemmend auf die Sekretproduktion, vermutlich in dem er eine Vasokonstriktion bewirkt (NICKEL et al., 2003). KOVACS et al. (2005) konnten bei Ratten zeigen, dass die elektrische Stimulation des Zervikalganglions eine Tränensekretion auslöst, indem es die konjunktivalen Becherzellen und die Tränendrüsen aktiviert.

2.6 Hormoneller Einfluss auf den Tränenapparat

Die okuläre Oberfläche, Tränenfilm und Tränendrüse arbeiten als funktionelle Einheit zusammen, um unter anderem die Qualität der refraktiven Oberfläche des Auges zu erhalten (ROLANDO u. ZIERHUT, 2001). In die Homeostase dieser funktionellen Einheit sind neuronale und hormonelle Regulationsmechanismen involviert (AZZAROLO et al., 1999; ROCHA et al., 2000; SULLIVAN et al., 2002; WICKHAM et al., 2000). Es bestehen einige geschlechts-spezifische Unterschiede in Morphologie und sekretorischer Funktion des Tränenapparates sowie der Empfänglichkeit für Krankheiten (CORNELL-BELL et al., 1985; SULLIVAN et al., 1990; MIRCHEFF et al., 1992). ROCHA et al. (2000) und WICKHAM et al. (2000) fanden Androgen-, Östrogen-, Prolactin- und Progesteron-Rezeptor-mRNA in der Tränendrüse, Meibom Drüsen, Konjunktiva, Kornea, Iris, Linse und Retina von Ratten, Kaninchen und Menschen. Die Frequenz des Auftretens dieser Rezeptor-mRNA zeigt gewebespezifische Unterschiede. Das Verteilungsmuster der Androgen-Rezeptoren in okulärem Gewebe scheint unabhängig vom Geschlecht zu sein, da die Verteilungsmuster bei männlich und weiblich Individuen gleich sind (ROCHA et al., 2000). Die Meibom Drüsen

von männlichen und weiblichen Individuen enthalten Androgen Rezeptor mRNA und Androgen Rezeptor Protein innerhalb der Zellkerne der Drüsenepithelzellen sowie die mRNA für das Enzym 5 α -Reduktase (WICKHAM et al., 2000; ROCHA et al., 2000). Dieses Enzym dient dazu Testosteron in das potente Androgen 5 α -Dihydrotestosteron umzuwandeln (DEPLEWSKI u. ROSENFELD, 2000). AZZAROLO et al. (1999) halten die Tränendrüse für ein androgen-abhängiges Organ und vermuten, dass Androgene dort trophisch wirken. Die bislang verfügbaren Daten deuten daraufhin, dass optimale bioverfügbare Spiegel von Androgenen essentiell für die normale Tränendrüsensfunktion sind und dass auch Östrogen und Prolaktin wichtige Rollen übernehmen (OPREA et al., 2004). SEAMON et al. (2008) vermuten, dass die Effekte der Geschlechtshormone in der Tränendrüse proteinspezifisch sind. Obwohl gezeigt werden konnte, dass ein Androgendefizit die Lipidprofile verändert, muss diese Veränderung nicht an der Augenoberfläche messbar sein (GREINER et al., 1998).

Tabelle 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Tränendrüse

	Unterschiede	Untersuchte Spezies	Autor
Weiblich	Stärkere Infiltration der Tränendrüse mit Lymphozyten Tränendrüse sezerniert geringere Mengen IgA und sekretorische Komponente.	Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Mensch	CORNELL-BELL et al. (1985) SULLIVAN et al. (1990)
Männlich	Drüsenregion der Tränendrüse signifikant größer. Höherer Anteil an sekretorischem Parenchym.	Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Mensch	CORNELL-BELL et al. (1985)

Abk.: IgA= Immunglobulin A

Tabelle 7: Einfluß und Effekte der Hormone auf den Tränenfilm

Hormon	Einfluß auf	Spezies	Effekt	Autor
Androgen	Immunglobulin A und seinen Rezeptor.	Ratte	Bei adulten männlichen Ratten wird IgA und sein Rezeptor vermehrt produziert.	SULLIVAN u. HANN (1989)
	Produktion von Peroxidase in der Tränendrüse.	Hamster	Deutliche Hemmung der Aktivität von Peroxidase. Beim weiblichen Tier ist die Aktivität 3,4-fach höher.	PALI WAL u. DE (2006)
	die neutralen und polaren Lipidprofile des Meibom Sekretes.	Maus Kaninchen Mensch	Ein Defizit führt zu signifikanten Veränderungen und nachfolgend zur Instabilität des Tränenfilms und EDE.	SULLIVAN et al. (2000) SULLIVAN et al. (2002)
	Qualität und Quantität der Lipide.	Maus Kaninchen Mensch	Verbesserung der Lipid-Qualität und Quantität.	SULLIVAN et al. (2000) KRENZER et al. (2000)
	Synthese und Freisetzung von Lipiden.	Kaninchen Hund Mensch	Unter topischer Anwendung von Androgenen kommt es zu einer Steigerung und einer Verlängerung der TFBUT.	WORDA et al. (2001)
	Tränensekretion und Tränenfilmstabilität.	Kaninchen	STT und TFBUT sind bei kastrierten männlichen Kaninchen signifikant geringer.	LUO et al. (2001)
	glanduläre Epithelzellen und konjunktivale Becherzellen.	Kaninchen	Bei kastrierten Kaninchen sind die Epithelzellen atrophisch, flach und in der Anzahl signifikant vermindert.	LUO et al. (2001)
	Muzinsynthese	Mensch	Geringere Expression von MUC1 und MUC5AC bei einem Patient mit CAIS.	MANTELLI et al. (2007)
	die Genaktivität für Proteine, die in Synthese und Sekretion von Lipiden involviert sind.	Maus	Gesteigerte Gentranskription und Synthese von Proteinen.	SCHIRRA et al. (2005)
	Gene in der Meibom Drüse, die in Zusammenhang mit Lipidstoffwechsel, Fettsäuremetabolismus und Proteintransport stehen.	Maus	Testosteron hat Einfluß auf die Expression von 1590 Genen. 1080 Gene werden signifikant hochreguliert und 518 Gene herunterreguliert.	SCHIRRA et al. (2005)
	Gene, die mit Keratinisierung und Einlagerung von Fetten in die Meibom-Drüsen assoziiert sind.	Maus	Suppression dieser Gene.	SULLIVAN et al. (2009)

Fortsetzung Tabelle 7

Hormon	Einfluß auf	Spezies	Effekt	Autor
Östrogen	die Regulation der Synthese von MMP-2 und MMP-9.	Kaninchen	Gesteigerte Synthese von MMP-2 und MMP-9.	ZYLBERBERG et al. (2007)
	Gene die in Zusammenhang mit Signalübermittlung, Transport, Enzymaktivität und zellulärer Organisation stehen, sowie immunologisch wirksame Gene.	Maus	Regulierung dieser Gene.	SUZUKI et al. (2006) SULLIVAN et al. (2009)
	das Phänomen der Harderianization der exorbitalen Tränen-drüse.	Ratte	Es kommt zum Verschwinden der lipidhaltigen Herde bei der weiblichen Drüse.	FERRERA et al. (2004)
Androgen und Östrogen	die Regulation der Tränen-Lipocalin Spiegel	Kaninchen	Bei männlichen Tieren sind die Spiegel deutlich höher als bei weiblichen Tieren. Mit sinkendem Geschlechtshormon-Spiegel im Alter kommt es zu einer reduzierten Expression von TL bei beiden Geschlechtern.	SEAMON et al. (2008)
Progesteron	Gene, die in Signaltransduktion, Zellkommunikation, Zellmetabolismus und Zellwachstum involviert sind, sowie immunologisch wirksame Gene.	Maus	Signifikanter Anstieg der Ablese-Aktivität bei diesen Genen.	SUZUKI et al. (2006) SULLIVAN et al. (2009)
Prolactin	die Drüsenzellaktivität und die Immunfunktion der Tränendrüse.	Mensch Ratte Kaninchen	Es könnte als endokriner, parakriner oder autokriner Modulator in der Tränendrüse agieren.	MIRCHEFF et al. (1992) WOOD et al. (1999)

Abk.: EDE= Evaporatives Trockenes Auge, CAIS= Komplette Androgenresistenz, IgA= Immunglobulin A, MMP= Matrix Metalloproteinase, MUC 1/ MUC5AC= Muzinklassen, TFBUT= Tränenfilmaufreißzeit, TL= Tränen Lipocalin, STT= Schirmer-Tränen-Test

2.7 Die Keratokonjunktivitis sicca

2.7.1 Klinisches Bild /Definition des trockenen Auges

Beim Mensch wurde das trockene Auge 2007 vom „International Dry Eye Workshop“ definiert als multifaktorielle Erkrankung des Tränenfilms und der Augenoberfläche, die mit okulären Symptomen, Visusminderung und Tränenfilminstabilität sowie mit möglichen Schädigungen der Augenoberfläche einhergeht. Das trockene Auge ist assoziiert mit einer erhöhten Osmolarität des Tränenfilms und einer Entzündung der Augenoberfläche

(DEWS, 2007). Das trockene Auge kann ätiopathogenetisch in zwei große Gruppen unterteilt werden, das hypovolämische trockene Auge (Aqueous-Deficient Dry Eye, ADDE) und das hyperevaporative trockene Auge (Evaporative Dry Eye, EDE) (DEWS, 2007). Beim Hund wird die Keratokonjunktivitis sicca meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Die Hunde blinzeln vermehrt, zeigen Blepharospasmus und Reiben die Augen am Boden oder mit den Pfoten. Der Lidbereich ist mit schleimig-eitrigem Augenausfluss verklebt, der auch auf der Kornea haften kann. Die Konjunktiven sind gerötet und geschwollen. Hornhautulzera treten auf und führen zu Vaskularisierung, Unebenheiten und Pigmentierung der Kornea (KASWAN et al., 1989; GRAHN u. STOREY, 2004).

2.7.2 Pathologie

Es gibt zahlreiche Ursachen für die Entstehung einer KCS beim Hund. Die häufigste ist vermutlich die immun-medierte Dacryoadenitis (KASWAN et al., 1989). Histopathologische Untersuchungen des Drüsengewebes zeigen eine multifokale chronische Adenitis, charakterisiert durch Drüsenatrophie mit Infiltration von Lymphozyten und Plasmazellen sowie vermehrt fibröses Stroma. Selbst wenn die Drüse makroskopisch unauffällig aussah, konnten unter dem Mikroskop kaum sekretorische Granula nachgewiesen werden (KASWAN et al., 1989). GAO et al. (1998) konnten bei an KCS erkrankten Hunden eine verstärkte Apoptose in der Nickhautdrüse und den konjunktivalen Epithelzellen im Vergleich zu gesunden Hunden nachweisen. Die entzündlichen Läsionen klassifizierten KASWAN et al. (1989) in drei Stadien (Tab. 8).

Tabelle 8: Klassifizierung der entzündlichen Läsionen im Bereich der Tränendrüse bei der Keratokonjunktivitis sicca des Hundes

Stadium 1	Entzündliche Läsionen tauchen zunächst als multifokale mononukleäre Infiltrate auf.
Stadium 2	Große ineinander übergehende Bereiche mit mononukleären Infiltraten.
Stadium 3	Zusammenfließende mononukleäre, entzündliche Infiltrate, fortgeschrittene Fibrose und Atrophie der Drüsenzellen.

Tränendrüsen im Stadium 1 und 2 können unter Behandlung mit CsA wieder funktionsfähig werden. Im Stadium 3 ist die Fibrose aber schon so weit fortgeschritten, dass eine Behandlung meist nicht mehr anspricht (KASWAN et al., 1989). Durch eine Störung eines Bestandteiles des Tränenfilms kommt es zu einem Circulus vitiosus, der weitere Schäden nach sich zieht und zur klinischen Ausbildung des trockenen Auges führt.

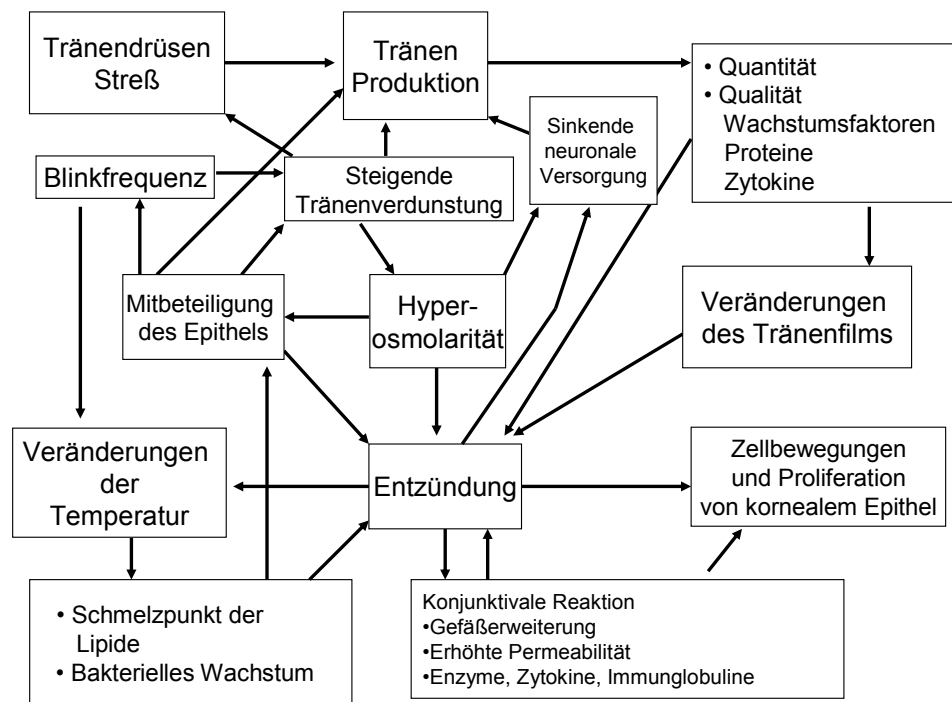


Abbildung 5: Circulus vitiosus bei der Keratokonjunktivitis sicca der zu Epithelschäden und klinischen Symptomen führt (Quelle: ROLANDO u. ZIERHUT, 2001)

Die Verdunstung des Tränenfilms triggert sowohl das evaporative trockene Auge als auch das Tränen-defiziente trockene Auge. Durch eine erhöhte Verdunstungsrate und inadäquater Tränenproduktion kommt es zu Hyperosmolarität, nachfolgender Entzündung mit Oberflächenschäden und einer veränderten Tränenfilmverteilung, wodurch die Verdunstung gesteigert wird. Beim Tränen-defizienten trockenen Auge kommt es durch die Hyposekretion zu einer Veränderung der Stabilität des Tränenfilms mit wiederum erhöhter Verdunstung, Hyperosmolarität, Entzündung, Epithelschäden und einer sich weiter verschlechternden Tränenfilmstabilität (ROLANDO u. ZIERHUT, 2001; MOORE u. COLLIER, 1990). Die Hyperosmolarität des Tränenfilms wird neben der Tränenfilminstabilität und der übermäßigen Evaporation als zentraler Mechanismus in der Pathogenese des trockenen Auges betrachtet. Die Hyperosmolarität stimuliert eine Kaskade entzündlicher Ereignisse in den Oberflächenzellen von Kornea und Konjunktiva. Proinflammatorische Zytokine und Metalloproteinasen werden aktiviert und stimuliert. Die zunächst subklinische Entzündung führt zur Apoptose von kornealen, konjunktivalen und Tränenrüseneithelien sowie zur neuronalen Störung der Tränenrüsensekretion (ROLANDO u. ZIERHUT, 2001). Bei Hunderassen mit Exophthalmus treten Tränenfilminstabilitäten leichter auf (SANSOM

u. BARNETT, 1985). Die dauerhafte erhöhte Stimulation der Tränendrüse, verursacht durch die gesteigerte Verdunstungsrate, könnte zu einer neurogen induzierten, immunologisch medierten Entzündung der Tränendrüse selbst führen und so das evaporative trockene Auge in ein Tränen-defizientes trockenes Auge umwandeln (STERN et al., 1998). Die Entzündung von Hornhaut und Konjunktiva ist beim Hund hauptsächlich durch eine T-Zell-Infiltration gekennzeichnet (KASWAN et al., 1989). Durch die Entzündung kommt es zu Keratinisierung und squamöser Hyperplasie der Konjunktiva. Da dort besonders viel Lymphozyten gefunden wurden, vermuten KASWAN et al. (1989), dass sie eine Rolle in der Induktion der squamösen Metaplasie spielen. Eine steigende Osmolarität der Tränen wiederum verursacht den Verlust von Becherzellen (GILBARD et al., 1988). Ein Verlust von Becherzellen ist verbunden mit sinkender Tränenaufrißzeit und trockenem Auge (TODA et al., 1995). Die Tränenflüssigkeit weist zudem durch die Verdunstung einen erhöhten Elektrolytgehalt auf, der sich schädlich auf die Augenoberfläche auswirkt und ebenfalls entzündliche Gewebereaktionen auslöst. Da das Auge auf Reizungen mit vermehrter Tränensekretion reagiert, kann es zunächst auch zu einem vermehrten Tränenfluss kommen (SCHARGUS u. GEERLING, 2009). Bei der Keratokonjunktivitis sicca zeigt sich unter anderem eine Veränderung der Glykosylierung der Muzine (HICKS et al., 1995; VERSURA et al., 1989). CARRINGTON et al. (1993) konnten bei ihren Untersuchungen eine ansteigende Sialylierung der Muzine bei an KCS erkrankten Hunde feststellen.

HICKS et al. (1995) bewerten den Hund als gutes Modelltier für die Untersuchungen der Veränderungen der okulären Muzinsekretion, da betroffene Hunde reichlich Muzin produzieren.

2.7.3 Ätiologie

Zahlreiche Ätiologien sind für die Entstehung der Keratokonjunktivitis sicca des Hundes beschrieben. Da die Ätiologie der caninen KCS in den meisten Fällen nicht ermittelt werden kann, wird eine immunbedingte Ätiologie vermutet. Diese Vermutung basiert darauf, dass bei den histologischen Untersuchungen mononukleäre Zellinfiltrate zusammen mit Tränendrüsenatrophie gefunden wurden und es zu einer Verbesserung der Symptome unter topischer Therapie mit CsA kommt (KASWAN et al., 1989; SANSOM et al., 1995; GRAHN u. STOREY, 2004; LINEK et al., 2007).

2.7.3.1 Nichtinfektiöse Ursachen

Tabelle 9: Nichtinfektiöse Ursachen der Keratokonjunktivitis sicca beim Hund

Ursache	Auswirkung	Literatur
Entfernung der Nickhautdrüse	<p>4 Monate nach <u>Exzision</u> STT I um 10-22% gesunken STT II um 42-43% gesunken</p> <p>1 Jahr nach <u>Exzision</u> STT I nicht signifikant verändert STT II reduziert BUT verkürzt</p> <p>Durch die Entfernung der Nickhautdrüse kommt es zu qualitativen Veränderungen des Tränenfilms (Reduktion des basalen Tränenvolumens und steigendem pH-Wert).</p>	SAITO et al. (2001) WAGNER u. HEIDER (1997) HELPER (1970)
Nebenwirkungen von Medikamenten <ul style="list-style-type: none"> • Sulfasalazin, Sulfadiazin, Sulfamethoxazol • Etodolac • Atropin • Lokale Anästhesie (Benoxinate) • Allgemeine Anästhesie (Medetomidin, Butorphanol) 	<ul style="list-style-type: none"> • Symptome einer KCS nach einer Behandlungsdauer von 2-6 Monaten möglich, evtl. durch direkten toxischen Effekt der Sulfonamide auf die Tränendrüse. • Immun-medierte Hypersensitivität oder ein lacrimotoxischer Effekt von Etodolac oder eines Metaboliten. • Durch parasympholytische Wirkung ist die basale und Reflextränenproduktion signifikant vermindert. • Vermutlich durch Vasokonstriktion der Blutgefäße der Tränendrüse kommt es zu signifikanter Reduzierung der STT I Werte. 	TREPANIER (2004) WILKIE u. WOLF (1990), SANSOM u. BARNETT (1985) MORGAN u. BACHRACH (1982) KLAUSS et al. (2007) LUDDERS u. HEAVNER (1979) HOLLINGSWORTH et al. (1992) SANCHEZ et al. (2006)
Kongenital beim Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) Yorkshire Terrier Bedlington Terrier	<ul style="list-style-type: none"> • Therapieresistente KCS in Kombination mit einer ichthyosisformen Dermatitis beim CKCS. • Kongenitale Alacrima beim Yorkshire Terrier und beim Bedlington Terrier. • Tränenhypoplasie bei Zwergrassen (Yorkshire Terrier, Mops). 	BARNETT (2006) WESTERMEYER et al. (2009) HERRERA et al. (2007) AGUIRRE et al. (1971)
Immun-medierte Zerstörung	<ul style="list-style-type: none"> • Autoimmun vermittelte Adenitis. Bei prädisponierten Rassen, wie WHWT und Cocker Spaniel möglicherweise erblich. • Autoimmun bedingte Erkrankungen, die auch die Lider betreffen und so zu einer qualitativen KCS führen können, wie canine Atopie, Lupus erythematodes und Pemphigus vulgaris. 	KASWAN et al. (1984, 1985, 1989) PENA u. LEIVA (2008)

Fortsetzung Tabelle 9:

Ursache	Auswirkung	Literatur
Metabolische Erkrankungen <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Hypothyreose • Hyperadrenocortizismus 	<ul style="list-style-type: none"> • Hunde mit Diabetes zeigen signifikant niedrigerer STT I, niedrigere BUT-Zeiten und geringere Becherzellichte. Die korneale Sensitivität ist signifikant reduziert (möglicherweise spielt Insulin eine Rolle in der Regulation der Tränendrüse). • Hunde mit Hypothyreose und Hyperadrenocortizismus zeigen erniedrigte STT I Werte. 	CULLEN et al. (2005) BARRERA et al. (1992a) WILLIAMS et al. (2007) ROCHA et al. (2000)
Neurologische Erkrankungen <ul style="list-style-type: none"> • <i>N.fazialis</i>-Lähmung • Dysautonomie 	<ul style="list-style-type: none"> • Nervenlähmung, Nervensystem-Dysfunktion. • Einzelfälle beim Hund beschrieben. Es kommt neben Erbrechen, Diarrhoe auch zu bilateraler KCS. 	KERN u. HOLLIS (1987) JAMIESON et al. (2002) WISE u. LAPPIN (1991)
Bestrahlung von malignen Neoplasien im Kopfbereich	KCS trat als Nebenwirkung bei 24% der Patienten in der Studie auf.	ROBERTS et al. (1987)
Hormoneller Einfluss	Weibliche Individuen sind häufiger von einer KCS betroffen.	KASWAN et al. (1991) SANCHEZ et al. (2007)
Alterung	Das Vorkommen von KCS steigt mit dem Alter der Hunde an.	KASWAN et al. (1991) SULLIVAN et al. (2002) GRAHN u. STOREY (2004)
Trauma	Verletzungen der Nerven im Kopfbereich oder der Lider, wodurch es zu einem unvollständigen Lidschluß kommt. In seltenen Fällen kann auch eine Otitis sekundär zu Schädigungen der versorgenden Nerven führen.	GELATT (2007)

Abk.: BUT= Tränenaufrißzeit; KCS= Keratokonjunktivitis sicca; STT= Schirmer-Tränentest; WHWT= West Highland White Terrier

2.7.3.2 Infektiöse Ursachen

Tabelle 10: Infektiöse Ursachen der Keratokonjunktivitis sicca beim Hund

Auslöser	Ursache	Literatur
Staupe (Canines Staupevirus)	Entzündung der Tränendrüsen mit degenerative Veränderungen und Infiltration von Entzündungszellen (Neutrophile, Plasmazellen, Lymphozyten).	MARTIN u. KASWAN (1984) BRITO et al. (2007)
Leishmaniose	Es wird je nach Autor eine Prävalenz von 2,8 bis 26,8% für KCS bei an Leishmaniose erkrankten Hunden beschrieben. Es bilden sich eitrig-granulomatöse Infiltrate um die Ausführungsgänge der Tränendrüse und der Meibom Drüsen. Es kommt zu einer retrograden Dilatation der Ausführungsgänge und zu einem Anstau der Sekrete.	NARANJO et al. (2005) PENA et al. (2000)
Meibomitis/Blepharitis	Aufgrund qualitativen Veränderungen der Lipidschicht, kommt es zu einer schnelleren Verdunstung des Tränenfilms.	PENA u. LEIVA (2008) WALDE et al. (2008)

Abk.: KCS= Keratokonjunktivitis sicca

2.7.3.3 Prädisponierte Rassen

Die Erkrankung ist häufiger bei älteren, weiblichen Tieren, wobei Cocker Spaniel und West Highland White Terrier die am häufigsten betroffenen Rassen sind. (HERRERA et al., 2007). KASWAN u. SALISBURY (1990) fanden bei Cavalier King Charles Spaniel und Englischen Bulldoggen ein besonders hohes Risiko an KCS zu erkranken. Die Englische Bulldogge, Lhasa Apso, Shih Tzu, West Highland White Terrier, Cavalier King Charles Spaniel und Cocker Spaniel gelten weltweit als prädisponierte Rassen (HERRERA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007). Eine Prädisposition für weibliche Tiere ist beim West Highland White Terrier beschrieben (SANSOM u. BARNETT, 1985).

Tabelle 11: Rassedispositionen für Keratokonjunktivitis sicca (KCS)

Rasse	Relatives Risiko für KCS
Cavalier King Charles Spaniel	11,5
Englische Bulldogge	10,8
Lhaso Apso	9,8
Shi Tzu	6,2
West Highland White Terrier	5,5
Mops	5,2
Bluthund	4,5
American Cocker Spaniel	4,1
Pekingese	4,0
Boston Terrier	2,0
Mini-Schnauzer	1,8
Samojede	1,7
Alle Rassen	1,0

Quelle: KASWAN u. SALISBURY (1990): A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca: Treatment with ophthalmic cyclosporine

2.7.4 Therapie

2.7.4.1 Konservative Therapie

Ziel ist die weitestgehende Rekonstruktion eines qualitativ und quantitativ ausreichenden Tränenfilms, der eine Erholung und Heilung des Oberflächenepithels und langfristig die Gesundung der Augenoberfläche erlaubt (GRAHN und STOREY, 2004). Abgesehen vom Schweregrad der Erkrankung ist auch die Lokalisation der Störung von erheblicher Bedeutung. Ein Ersatz des wässrigen Anteils ist nur dann wirksam, wenn bei normaler Muzinproduktion auch eine stabile Lipidschicht vorhanden ist. Die erfolgreiche Stimulation der eigenen Tränenproduktion ist für den Verlauf der Erkrankung prognostisch am günstigsten (GRAHN u. STOREY, 2004).

Lakrimostimulans

Diese Medikamente stimulieren die Tränenproduktion. Dazu gehören die Immunmodulatoren Cyclosporin A, Tacrolimus, Pimecrolimus und Cholinergika wie Pilocarpin.

Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein 11 Aminosäuren umfassendes zyklisches, lipophiles Peptid, das ursprünglich aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen wurde. CsA entfaltet seinen therapeutischen Effekt, indem es die Proliferation der T-Lymphozyten und deren Infiltration der Tränendrüse inhibiert und somit eine Regeneration der Drüse erlaubt, um ihre sekretorische Funktion wieder aufnehmen zu können. Zusätzlich wirkt CsA therapeutisch durch den stimulatorischen Effekt auf die Tränendrüse, den proliferativen Effekt auf die konjunktivalen Becherzellen und den hemmenden Effekt auf die Apoptose von Drüsenzellen (SALISBURY et al., 1990). Die T-Zellen werden dadurch aktiviert, dass ihr Oberflächenrezeptor (TCR) zusammen mit dem Oberflächenmolekül CD4 an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-II) der antigen-präsentierenden Zellen bindet. Über die MHC/TCR-Bindung hinaus muss zur Aktivierung der T-Zelle eine Bindung zwischen deren Kostimulator CD28 und dem CD80/86 Molekül auf der antigenpräsentierenden Zelle erfolgen. Bei der so aktivierten T-Zelle kommt es zu einem starken Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Raum in das Zytoplasma. Kalzium wiederum bindet an ein intrazelluläres Protein namens Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert daraufhin einen weiteren intrazellulären Botenstoff, den „Nuclear Factor of activated T-cells“ (NFAT). Dieser wandert in den Zellkern, bindet an den Transkriptionsfaktor AP-1 und induziert die Produktion verschiedener Zytokine, allen voran das Interleukin-2 (IL-2). IL-2 ist ein wichtiges Wachstumssignal für T-Zellen und führt zu deren klonaler Expansion (MOORE, 2004; LINEK et al., 2007). Appliziertes CsA diffundiert passiv durch die Zellmembran der T-Zelle und bindet spezifisch an ein intrazelluläres Molekül namens Cyclophilin. Der daraus hervorgehende Komplex aus CsA und Cyclophilin bindet an Calcineurin und inhibiert damit dessen Phosphorylierungskapazität, so dass der Signalstoff NFAT nicht mehr aktiviert werden kann. Hierdurch bleibt die Zytokinsynthese aus, die für eine klonale Proliferation der T-Zelle notwendig wäre. Die Unterdrückung der T-Zell-Proliferation wiederum reduziert die zelluläre Immunabwehr. Diese Wirkung von CsA ist dosisabhängig (MOORE, 2004). Es werden aber auch noch andere regulative Mechanismen des Immunsystems beeinflusst, z.B. die Produktion von IL-3, IL-4 und dem Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor.

Die Produktion von Tumor Nekrose Faktor- α und Interferon- γ werden vermindert und der immunsuppressiv wirkende Transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) stimuliert (MOORE, 2004). Weitere Effekte von CsA auf die Immunzellen sind die Hemmung der Antigenpräsentation in Langerhans Zellen und eine verminderte Aktivität von B-Lymphozyten durch eine verringerte Synthese von IL-4 und CD40L, die sonst B-Zellen stimulieren. Die Auswirkung auf die Funktion des humoralen Immunsystems ist jedoch begrenzt. Die Synthese von IgA, IgG und IgM wird nicht nennenswert beeinflusst (MATSUDA u. KOYASU, 2000). Neben dem immunmodulierenden Effekt hat CsA auch Einfluß auf Epithelzellen. CsA unterdrückt die Proliferation humaner Keratinozyten in vitro (FURUE et al., 1988) und verzögert in vivo die Wundheilung bei der Ratte (PETRI et al., 1998). Die Induktion von TGF- β kann neben den erwähnten immunologischen Effekte auch zu einer erhöhten Synthese von extrazellulären Matrix führen (MATSUDA u. KOYASU, 2000). Dieser Mechanismus ist vermutlich für die relativ häufig beschriebene gingivale Hyperplasie verantwortlich. Des Weiteren stimuliert CsA, vermutlich über Inhibition von Prolactinrezeptoren, die Tränendrüsenaktivität (KASWAN u. SALISBURY, 1990). Am Auge dringt CsA nach topischer Applikation leicht in das Hornhautepithel ein, kann aber die Kornea aufgrund des hydrophilen Endothels nicht penetrieren. CsA erreicht hohe Wirkstoffkonzentrationen in Kornea, Konjunktiva, Sklera und Tränendrüsen, bewirkt aber keine nennenswerte systemische Resorption (KASWAN u. SALISBURY, 1990; ACHEAMPONG et al., 1999). Nach einer einmaligen Gabe wird eine hohe Konzentration für drei Stunden in der Tränendrüse und für 96 Stunden in der Kornea erreicht (ACHEAMPONG et al., 1999). Nach oraler Applikation kann es nicht oder nur in geringsten Mengen im Auge nachgewiesen werden, da es die Blut-Augen-Schranke nicht überwinden kann (MOORE, 2004). Auch wenn in manchen Fällen die Tränenproduktion nicht messbar gesteigert werden kann, ist ein Rückgang der Sekundärveränderungen an der Kornea wie Neovaskularisation, Bildung von Granulationsgewebe und Pigmentierung zu beobachten (SALISBURY et al., 1990). Die klinische Verbesserung ist assoziiert mit einem histologisch nachweisbaren Rückgang von Drüsenentzündung und Regeneration des Drüsengewebes (BOUNOUS et al., 1995). Auch konnten STRONG et al. (2005) zeigen, dass es unter Behandlung mit CsA zu signifikant weniger Apoptose im konjunktivalen Epithelium kommt. Da sinkende Becherzellzahlen zu den ersten Veränderungen beim trockenen Auge gehören, ist die Becherzellichte ein sensibler Indikator für Augenoberflächenerkrankungen. Unter CsA Therapie wird eine signifikante Becherzellstimulation und verbesserte Muzinsekretion

beschrieben (MOORE et al., 2001). Vermutet wird hier ein direkter epitheliotroper Effekt. KUNERT et al. (2002) konnten beim Mensch sogar einen fast 200%igen Anstieg der Becherzell-dichte feststellen. Daher ist CsA auch eine hilfreiche Therapie bei qualitativen Tränenfilmveränderungen, wie sie sich häufig nach Muzindefizit entwickeln. Der therapeutische Effekt tritt beim Hund in der Regel schnell ein, kann aber gelegentlich erst nach zwei Monaten erkennbar sein (KASWAN et al., 1989). Die Nephrotoxizität von CsA ist spezies-spezifisch und tritt bei Hunden und Affen nicht auf. Bei topischer Therapie am Auge kommt es selten zu Nebenwirkungen, wie Irritationen und Konjunktivitis (LINEK et al., 2007). CsA wird kommerziell als 0,2%ige Augensalbe (Optimmune) angeboten, individuell hergestellt werden auch stärkere Konzentrationen mit 1 oder 2% in Maisöl. Die Applikation wird zweimal täglich empfohlen (KASWAN et al., 1989).

Tacrolimus (FK506)

Dabei handelt es sich um ein Makrolid Antibiotikum, welches von *Streptomyces tsukubaensis* produziert wird. Wie CsA wirkt es als Zytokin-Suppressor, indem es Calcineurin hemmt (MOORE, 2004). Es bindet allerdings nicht wie CsA an das Immunophilin Cyclophilin, sondern an das Immunophilin FK506-Binding Protein (MOORE, 2004). Tacrolimus penetriert, da es weniger lipophil ist und durch seine geringere Molekülgröße, die Haut in vitro besser als CsA (LAUEMA et al., 1997). Auch ist es in vitro 10 bis 100-fach potenter in der Inhibition von zytotoxischen Lymphozyten und der Produktion von IL-2, IL-3 und Interferon- γ (SCHREIBER u. CRABTREE, 1992). Tacrolimus kann in einer wässrigen Suspension verabreicht werden, wodurch es zu weniger Irritationen auch im periokulären Bereich kommt. BERDOULAY et al. (2005) wendeten 0,025%iges Tacrolimus zweimal täglich bei caninen KCS Patienten an und konnten eine signifikante Erhöhung der Tränenproduktion feststellen.

Pimecrolimus

Pimecrolimus ist ein Derivat von Ascomycin. Auf molekularer Ebene bindet Pimecrolimus an den zytoplasmatischen Rezeptor Macrophillin 12 und inhibiert Calcineurin und verhindert so die Produktion von entzündlichen Zytokinen wie CsA und Tacrolimus auch. Pimecrolimus besitzt eine höher intrinsische Potenz als CsA und durch das niedrigere Molekulargewicht (Pimecrolimus 811 Dalton, Cyclosporin 1202 Dalton, Tacrolimus 804 Dalton) eine höhere Gewebepерmeabilität (HAMAWY, 2003). In vitro wurde festgestellt, dass Pimecrolimus die zytokinproduzierenden Zellen 10-fach effektiver hemmt als CsA (MEINGASSNER et

al., 1997). NELL et al. (2005) konnten unter Behandlung mit 1%igem Pimecrolimus auf öliger Basis eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptome bei caninen KCS Patienten sehen. OFRI et al. (2007a) zeigten in einer klinischen Studie, dass Pimecrolimus die Entzündungen am Auge besser eindämmt als CsA. Die Wirkung von 1%igem öligen Pimecrolimus war in leichten und schweren Fällen von KCS gut. Nach 8 Wochen Behandlung erwies sich Pimecrolimus in der Kontrolle der klinischen konjunktivalen und kornealen Entzündungsanzeichen besser als CsA.

Pilocarpin

Dabei handelt es sich um ein Parasympathomimetikum, welches unspezifisch das parasympathische Nervensystem und damit auch die Tränen- und Nickhautdrüse stimuliert (RUBIN u. AGUIRRE, 1967). Es wird bei neurogen bedingter KCS angewendet. Es kann oral oder topisch verabreicht werden. Bei topischer Anwendung führt es aufgrund seines ungünstigen pH-Wertes häufig zu Irritationen (SMITH et al., 1994) und wird deshalb oral verabreicht. Die initiale Dosis (zweimal täglich einen Tropfen einer 2%igen Lösung pro 10 kg KGW) wird gesteigert, bis ein Effekt bei der Tränensekretion beobachtet wird und die bekannten Nebenwirkungen wie Speichelfluß, Erbrechen, Diarrhoe und Bradycardie noch nicht auftreten (WALDE et al., 2008).

Lakrimomimetika (Tränenersatz)

Diese versuchen die verschiedenen Schichten des Tränenfilms zu ersetzen und wirken nur symptomatisch. Wenn möglich sollten konservierungsmittelfreie Lösungen angewendet werden, da diese bei höherer Tropffrequenz toxisch auf die die Oberfläche des Auges wirken und zu zusätzliche Schädigung des Tränenfilms beitragen (GRAHN u. STOREY, 2004).

Tabelle 12: Häufig verwendete Tränenersatzstoffe bei Mensch und Hund

Inhaltsstoff	Wirkung	Literatur
Synthetische Polymere Polyvinylalkohol Polyvinylpyrrolidon (Polyvidon) Polyacrylate (Carbomere)	Verlängerung der Verweildauer auf der Augenoberfläche. Polyacrylate wirken außerdem bakterizid und fungizid.	MOORE (1998)
Cellulosederivate Methylcellulose Hydroxypropylmethylcellulose (Hypromellose, HPMC) Hydroxyethylcellulose (Hyetellose, HEC)	Besitzen oberflächenaktive Eigenschaften. Erhöhen die Verweildauer des Tränenfilms. HPMC ist zudem auch pflegend und beruhigend.	MOORE (1998)

Fortsetzung Tabelle 12

Inhaltsstoff	Wirkung	Literatur
Hyaluronsäure	Enge strukturelle Ähnlichkeit mit den physiologischen Muzinen. Besitzt die Fähigkeit Wasser zu speichern sowie benetzende und viskoelastische Eigenschaften.	POLACK (1982)
Carbomer (polymere Acrylsäure vernetzt mit Allyl-Saccharose)	Künstlich hergestelltes Gel, welches Feuchtigkeit in seinem Gelgerüst binden kann. Dieses Gelgerüst wird durch die Salze der Tränenflüssigkeit aufgelöst und gibt so die fehlende Feuchtigkeit ans Auge ab.	MOORE (1998)
Autologe Serumtropfen	Augentropfen aus Eigenserum sind prinzipiell nicht allergen und in ihren biomechanischen und biochemischen Eigenschaften mit denen der natürlichen Träne vergleichbar. Sie enthalten unter anderem Wachstumsfaktoren, Vitamine und Fibronektin. In Zellkulturen unterstützen sie Proliferation, Morphologie und Stoffwechsel der Hornhautepithelzellen.	TSUBOTA et al. (1999) GEERLING u. HARTWIG (2002)

Tabelle 13: Weitere Maßnahmen zur Behandlung des trockenen Auges, von denen einige noch in der klinischen Erprobung sind (aus der Human- und der Veterinärmedizin)

Maßnahme	Wirkung	Literatur
Topische Anwendung von Acetylcystein (ACC)	Bei überschießender Muzinproduktion und zähem Sekret kann eine lokale mukolytische Therapie beim Hund erforderlich sein. Zudem wirkt ACC auch als Antikollagenase und kann so den weiteren enzymatischen Abbau von Oberflächengewebe verhindern sowie unterstützend bei der Heilung von Hornhautulzera wirken.	MOORE (1998)
Antibiotische Augensalbe	Schützt das Auge des Hundes vor Sekundärinfektionen, da ihm mit dem Tränenfilm auch zahlreiche protektive Mechanismen fehlen. Durch die Reduktion der Keime am Lidrand kommt es zu weniger Irritationen der Augenoberfläche durch Metabolite der Bakterien.	WALDE et al. (2008)
Systemische Anwendung von Doxycyclin	Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) wird häufig im Tränenfilm von Menschen mit entzündlichen Augenoberflächenerkrankungen gefunden. Die Quelle dieser Protease ist unklar. Es wird vermutet, dass MMP-9 aufgrund der Freisetzung von Interleukinen durch die Epithelzellen oder von den infiltrierenden Neutrophilen produziert wird. Doxycyclin scheint die Interleukin Freisetzung und damit auch die MMP-9 Synthese zu blockieren.	SMITH et al. (2008)

Fortsetzung Tabelle 13:

Maßnahme	Wirkung	Literatur
Osmoprotektion	Dabei handelt es sich um Tränenersatzmittel mit kompatiblen Soluten (dies sind kleine lösliche, organische Moleküle, die als Stressprotektiva fungieren, wie Glycerin und Levocarnitin). In vitro führt bei osmotischem Stress die Gabe von L-Carnitin an humanen Hornhautepithelzellen zu reduzierter Aktivierung von Stresssignalen wie mitogenaktivierte Proteinkinasen. In klinischen Studien reduzierten diese Tränenersatzmittel die klinischen Symptome des trockenen Auges.	MESSMER (2007)
Topische Anwendung von Androgen	Nach dreimonatiger täglicher Anwendung kam es beim Mensch zu einer Normalisierung von BUT und Lipidschichtdicke.	WORDA et al. (2001)
Topische Anwendung von Östradiol	Bei postmenopausalen Frauen, die an KCS leiden kam es zu einer signifikanten Verbesserung der STT Werte nach der topischen Anwendung von Östradiol.	SATOR et al. (1998)
Topische Anwendung von Retinoid	Vitamin A-Abkömmlinge fördern beim Mensch die Differenzierung von Becherzellen.	KIM et al. (2009)
Topisch Anwendung von omega-3 und omega-6 Fettsäuren	Nach Applikation bei Mäusen mit trockenen Augen kam es zu einer Reduktion der kornealen Infiltration mit Leukozyten und sinkender Zytokin-Expression und deutlich geringere Entzündungsanzeichen am Auge.	RASHID et al. (2008)
Fettsäuren als diätetische Ergänzung	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren greifen durch anti-inflammatorische Prostaglandine und Leukotriene in die Entzündungskaskade ein. Nach einem halben Jahr täglicher Anwendung kam es beim Mensch zu einer signifikanten Verbesserung der Entzündungsanzeichen am Auge.	CREUZOT et al. (2006)
Pflege des Lidrandes	Maßnahmen zur Behandlung von Störungen der Lipidphase zielen auf eine verbesserte Funktion der Meibom-Drüsen ab. Durch Applikation von Wärme auf das Augenlid, wurde der Fluss des Meibom Sekretes erhöht. Bereits nach zwei Wochen wird bei einer täglichen Behandlung über fünf Minuten eine deutlich bessere Öffnung der Meibomdrüsen-Ausführungsgänge erreicht. Es sind zahlreiche weitere Systeme zur Pflege des Lidrandes erhältlich.	NAGYMIHALYI et al. (2004)
Topische Applikation von Nukleotiden (wie UTP)	Es kommt zu einer Erhöhung des Lysozym-Gehaltes in der Tränenflüssigkeit.	PERAL et al. (2008)

Abk.: BUT= Tränenaufrißzeit; KCS= Keratokonjunktivitis sicca; STT= Schirmer-Tränen-Test, UTP= Uridintriphosphat

2.7.4.2 Chirurgische Therapie

Trotz der revolutionären Entdeckung der Lakrimostimulans wie Cyclosporin A und Tacrolimus zur Behandlung der KCS sprechen etwa 5% der Hunde nicht auf eine medikamentöse Therapie an (WILLIAMS, 2002). In diesen Fällen, in denen durch eine dreimonatige medikamentöse Behandlung keine Besserung erzielt werden kann, stehen zusätzlich chirurgische Maßnahmen zur Verfügung.

Okklusion der Tränenpunkte

Ein Verschluss der Tränenpunkte durch Anbringen einer Ligatur, Kauterisierung oder das Einlegen von Implantaten aus Gelatine und elastischen Silikonen vermindert die Abflußrate der natürlichen oder künstlichen Tränenflüssigkeit aus dem Auge. WILLIAMS (2002) untersuchte die Verwendung von Silikon-Implantaten bei caninen KCS Patienten. Er legte einen medizinischen Silikon-Stöpsel in den ventralen Tränenpunkt ein. WILLIAMS (2002) stellte bei seiner Untersuchung fest, dass die Hunde einen mittleren STT-Wert-Anstieg von $3,8 \pm 2,7$ mm/Min zeigten, wodurch es zu einer Verbesserung der klinischen Symptome wie Blepharospasmus und Ausfluß kam. Bei Tieren bei denen sich die STT-Werte nicht verbesserten kam es dennoch zu einer Optimierung des Effektes der Tränenersatzmedikamente. Die Besitzer berichteten, dass die Frequenz der Anwendung reduziert werden konnte. Da der Verschluss lediglich die produzierten Tränen länger im Tränensee hält und nicht die Sekretion anregt, profitieren Hunde die initial einen STT I Wert von 0mm zeigen nicht von einem Verschluss. Diese Tiere sollten von vornherein von dieser Methode ausgeschlossen werden. WILLIAMS (2002) hält den Verschluss des Tränenpunktes für eine sinnvolle mögliche Ergänzung in der medikamentösen Therapie der KCS. GELATT et al. (2006) setzten Stöpsel in den unteren und oberen Tränenpunkt. Die unteren verblieben besser in ihrer Position. Der Effekt auf die STT I Werte war nur gering. Der Verschluss des oberen Tränenpunktes führte sogar zu niedrigeren Werten. PFUGFELDER et al. (2002) deuten an, dass sich eine frühzeitige Okklusion der Tränenpunkte negativ auf das Biofeedback auswirkt. GUMUS u. CAVANAGH (2009) weisen noch darauf hin, dass ein solcher Verschluss erst erfolgen soll, wenn die Entzündung der Augenoberfläche unter Kontrolle ist. Sonst werden die entzündlichen Zellen, Zytokine und Matrix Metalloproteinasen unnötig lange auf der Augenoberfläche gehalten.

Transposition des Ductus parotideus

Eine weitere chirurgische Möglichkeit ist die chirurgische Transposition des Ausganges des Ductus parotideus in den Bindehautsack (GELATT, 1970). Vor der Operation sollte der Speichelfluss geprüft werden, da viele Hunde neben einer Xerophthalmie auch an einer Trockenheit der Maulschleimhaut leiden (vergleichbar mit dem Sjögren Syndrom des Menschen). Im Allgemeinen beträgt die Erfolgsrate bei sachgerechter Transposition zwischen 63 und 90% (GELATT, 1970; SCHMIDT et al., 1979).

Transplantation der submandibularen Drüse

CHEN et al. (2008) transplantierten beim Hund die submandibuläre Drüse mit ihrem Ausführungsgang und der versorgenden Arterie in die temporale Region. Wenige der verpflanzten Drüsenzellen atrophierten, durch Szintigraphie konnte aber lebensfähiges Drüsengewebe nachgewiesen werden. CHEN et al. (2008) sehen die Verpflanzung der submandibularen Drüse als eine gute Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit KCS an.

3 FRAGESTELLUNGEN

Verschiedene Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Wie hoch ist der Proteingehalt im Tränenfilm des Hundes und können die Haupttränenproteine, wie sie vom Mensch bekannt sind, dargestellt werden?

Gibt es Unterschiede im Tränenproteinprofil zwischen gesunden WHWT und gesunden Hunden anderer Rassen? Gibt es Unterschiede im Proteinprofil in Bezug auf Alter und Geschlecht?

Wie verändert sich die Zusammensetzung der Tränenfilmproteine bei einer Erkrankung an KCS beim WHWT? Zeigen sich Früherkennungsmerkmale oder Unterschiede beim Alter und dem Geschlecht und zeigt sich eine Prädisposition? Lassen sich Biomarker identifizieren?

Wie ändert sich das Tränenfilmproteinspektrum unter Behandlung der Keratokonjunktivitis sicca und zeigen sich Unterschiede bei der Wirkung der angewendeten Medikamente?

4 MATERIAL UND METHODEN

Hier wird zunächst der theoretische Hintergrund der Methoden beschrieben. Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind unter 4.1 aufgeführt.

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Aceton	Fa. Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Fa. Merck, Darmstadt
BCA-Kit	Fa. Pierce Biotechnology, USA
Bidestilliertes Wasser (H ₂ O _{VE})	Apotheke Uniklinik Mainz
Dodecyl-β-D-maltosid	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS (Dulbecco`s Phosphate Bufferes Saline)	Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA
Dynabeads®RPC 18	Fa. Invitrogen, Norwegen
Ethanol HPLC grade	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluoreszein-Teststreifen	Fa. HaagStreit, GmbH, Wedel
Handschuhe (Purple Nitrile)	Fa. Kimberly-Clark, USA
Konische Zentrifugenröhrchen (Falcontubes)	Fa. Fisher, Frankfurt
Methanol HPLC grade	Fa. Fischer, UK
Microcon®Centrifugal Filter	Fa. Millipore, USA
Mikrotiterplatte 96 well (Costar®3595)	Fa. Vitaris, Schweiz
Peptidstandard MS	Fa. Bruker Daltonik, Bremen
Pipettenspitzen (ep T.I.P.S Standard) 100μ, 500μ, 1ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2,0ml; 1,5ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Schirmer-Tränen-Test-Streifen	Fa. Tearex, Dioptrix, France
Sinapinsäure (Matrix Seldi)	Fa. Fluka Sigma-Aldrich, Steinheim
Trifluoressigsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Wasser HPLC grade	Fa. Baker, Deventer, Holland
Tücher, fusselfrei	Fa. KIMTECH Science, Reigate, UK
Zimtsäure (a-Cyan-4-Hydroxy-Zimtsäure)	Fa. Fluka Sigma-Aldrich, Steinheim

Gerät

Brutschrank
 Gefrierschrank (Herafreeze HFU 586 Basic)
 Kühlschrank (Thermostatschrank)
 Massenspektrometer Ultraflex II MALDI TOF/TOF
 Multiscan Ascent
 Pipetten (0,5µl-5000µl)
 Probenträger (Target) MTP AnchorChip™ 600/384
 Probenträger (Target) Steel™ target
 Protein-Chip (H50)
 Rotations- Schüttler (Intellimixer)
 SELDI-TOF-MS
 SpeedVac (Concentrator 5301)
 Stoppuhr
 Untersuchungslampe Heine
 Waage (MC1 Analytic AC 120S)
 Zentrifuge (Biofuge primo R)

Hersteller

Fa. Heraeus Instruments, Hanau
 Fa. Heraeus Instruments, Hanau
 Fa. Liebherr, Rostock
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Fa. Thermo Scientific, USA
 Fa. Eppendorf, Hamburg
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Fa. CIPHERGEN Biosystems, USA
 Fa. neoLab, Heidelberg
 Fa. CIPHERGEN Biosystems
 Fa. Eppendorf, Hamburg
 Fa. neoLab, Heidelberg
 Fa. Eickemeyer, Tuttlingen
 Fa. Sartorius, Göttingen
 Fa. Heraeus Instruments, Hanau

Software

Ascent Software
 BioTools Suchsoftware für Datenbanken
 FlexControl Steuersoftware für MALDI
 FlexAnalysis Auswertesoftware für Spektren
 Proteomic Software Project (PSP)
 Statistika 8.0

Hersteller

Fa. Thermo Scientific, USA
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 Experimentelle Ophthalmologie, Mainz
 StatSoft®, Hamburg

4.2 Gewinnung der Tränenproben

Die Gewinnung von Tränen mittels Mikrokapillare wird in der Humanmedizin häufig angewendet, hat jedoch den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwendig und mit Verletzungsgefahr für den Patienten verbunden ist. Dies trifft besonders beim unsedierten Hund zu. Eine Alternative bietet die Elution von Tränenflüssigkeit aus den Streifen des Schirmer-Tränen-Tests, die eine schnelle, einfache und zuverlässige Methode der Tränengewinnung darstellt (UNRATH, 2008). Der Schirmer-Tränen-Test gilt in der Ophthalmologie als Standard in der Beurteilung der Tränensekretion. Für diese Untersuchung wurde bei den Hunden der Schirmer-Tränen-Test I ohne vorherige Lokalanästhesie durchgeführt. Der Umgang mit den

Schirmer-Streifen erfolgte ausschließlich mit Handschuhen, um eine Verunreinigung mit Hautproteinen des Untersuchers zu vermeiden. Nachdem die Schirmer-Tränen-Test Streifen eine Minute am Auge verblieben waren, wurden die Streifen in ein beschriftetes 2,0ml Reaktionsgefäß verbracht, luftdicht verschlossen und bei -40°C tiefgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung im Labor wurden die gesammelten Proben bei -80°C gelagert.

4.3 Tiere

Bereits 2004 wurden Tränenproben von 43 West Highland White Terriern gesammelt und mit Hilfe des SELDI-TOF-MS untersucht. Von März 2008 bis November 2008 wurden 165 Hunde ophthalmologisch untersucht. Die erkrankten Hunde wurden als Patienten in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin und der Tierärztlichen Praxis Dr. Fengler und Dr. Emmelmann, Berlin vorgestellt. Die Proben der 140 augengesunden Hunde für die Kontrollgruppe stammten aus dem Patientengut der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin, Hunden der Mitarbeiter und Studenten der FU Berlin sowie dem Tierheim Berlin. Eine detaillierte Auflistung der Tiere, unter Angabe von Alter, Geschlecht, Rasse und Behandlung erfolgt in Tabelle 21 im Anhang (Kap.12). Nach der Messung mit dem Massenspektrometer konnten 135 Proben von 130 Tieren in die weitere Auswertung einbezogen werden. In die statistische Auswertung wurden nur die 118 Proben der 118 gesunden Hunde einbezogen. Da von den erkrankten und behandelten Tieren zu wenige Proben für eine statistische Auswertung übrig blieben, wurden diese Spektren nur deskriptiv beschrieben.

In die statistische Auswertung wurden nur Spektren einbezogen, die folgende Kriterien erfüllten:

- Spektren, die ein hohes Signal-Rauschverhältnis zeigen
- gut abgesetzte Peaks
- eine Mindestintensität der relevanten Peaks von 800

4.3.1 Klinische Augenuntersuchung

Die ophthalmologische Untersuchung der Hunde erfolgte anhand des angefertigten Untersuchungsbogens (siehe Anhang, Kapitel 12). Zunächst wurde bei Tageslicht die Umgebung der Augenlider, die Lidränder und die Konjunktiven untersucht. Anschließend wurden Kornea und Lidränder mit einer Heine Untersuchungslampe auf Veränderungen hin begutachtet. Die zum Zeitpunkt der Untersuchung verabreichten Medikamente wurden anamnestisch erfragt.

4.3.2 Schirmer-Tränen-Test

Im Anschluß an die ophthalmologische Untersuchung wurde der Schirmer-Tränen-Test I mit Hilfe einer Stoppuhr für eine Minute durchgeführt. Es wurden steril verpackte STT Streifen (Tearex®, Dioptrix, Frankreich) ohne Indikator verwendet. Der Schirmer-Streifen wurde schon in der Verpackung geknickt und der Streifen mit Handschuhen in das untere Augenlid eingehängt. Nach einer Minute wurde der Streifen entfernt und in ein beschriftetes 2,0ml Reaktionsgefäß verbracht und umgehend tiefgefroren.

4.3.3 Einteilung der Probanden

Die Einteilung in erkrankte und gesunde Tiere erfolgte aufgrund des Vorberichtes durch den Tierhalter und der Ergebnisse der ophthalmologischen Untersuchung. Die gesunden Hunde der Kontrollgruppe wurden zusätzlich in verschiedene Rassegruppen aufgeteilt. Eine weitere Aufteilung der behandelten, an KCS erkrankten Hunde wurde anhand der verwendeten Medikamente durchgeführt.

Die Einteilung erfolgte in folgende Gruppen:

Gruppe 1: Klinisch augengesunde Hunde verschiedener Rassen. Als Einschlußkriterien wurde eine unauffällige ophthalmologischen Untersuchung und ein STT I Testergebnis über 15 mm/Min definiert. Als Ausschlußkriterien wurden die Verwendung von Medikamenten am Auge, ein STT I Wert unter 15mm/Min und die systemische Behandlung mit Cyclosporin A definiert. Zudem durften die Hunde nicht an einer endokrinologischen Erkrankung, wie Diabetes mellitus, Hypothyreose oder Hyperadrenokortizismus leiden. Die Gruppe wurde zusätzlich anhand der verschiedenen Rassen in Untergruppen aufgeteilt.

Gruppe 2: West Highland White Terrier, die aufgrund der Anamnese und der ophthalmologischen Untersuchung als KCS-Patienten eingestuft wurden. Diese Tiere wurden bislang nur mit antibiotischen Augensalben oder Lakrimomimetika behandelt.

Gruppe 3: West Highland White Terrier, die an KCS erkrankt sind und bereits ursächlich therapiert wurden. Da die Hunde mit verschiedenen Medikamenten bzw. unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden, wurde eine weitere Aufteilung vorgenommen.

Um die Veränderungen der Tränenfilmproteine in Beziehung zum Alter der Tiere zu betrachten wurden sie in Altersgruppen eingeteilt. Hunde im Alter von 0 bis 5 Jahren wurden in die Gruppe 5, solche von 6 bis 10 Jahren in die Gruppe 10 und alle Hunde über 11 Jahren in die Gruppe 15 eingeteilt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Anzahl der Tiere, von denen auswertbare Tränenfilmproben zur Verfügung standen innerhalb der verschiedenen Patientengruppen

Gruppe	Einschlußkriterium	Altersgruppe	Geschlecht
Gruppe 1 n= 118 Tiere	Gesunde Hunde verschiedener Rassen	5= 47 Tiere 10= 51 Tiere 15= 20 Tiere	m= 39 mk= 18 w= 25 wk= 36
Gruppe 2 n= 3 Tiere	An KCS erkrankte, unbehandelte WHWT n= 5 Augen	--	mk= 2 wk= 1
Gruppe 3 n= 9 Tiere	An KCS erkrankte, behandelte WHWT n= 12 Augen	--	m= 2 mk= 2 w= 3 wk= 2

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich; wk= weiblich-kastriert

Gruppe 1: Gesunde Hunde verschiedener Rassen (n=118)

Tabelle 15: Anzahl der Tiere innerhalb der verschiedenen Rassen

Gruppe	Rasse	Anzahl der Tiere
1.1	West Highland White Terrier	29
1.2	Staffordshire Terrier	14
1.3	Deutscher Schäferhund	7
1.4	Mischlinge	22
1.5	Labrador	5
1.6	Hunde anderer Rassen	41

Gruppe 2: An KCS erkrankte, unbehandelte West Highland White Terrier (n=5)

Einschlußkriterium für diese Gruppe ist eine unbehandelte KCS. Es handelt sich um 5 Tränenproben von 3 Tieren. Zwei der Hunde sind männlich-kastriert und ein Hund weiblich-kastriert. Die männlichen Tiere sind beide 14 Jahre alt, das weibliche Tier ist 7 Jahre alt.

Gruppe 3: An KCS erkrankte, behandelte West Highland White Terrier (n=12)**Tabelle 16: Anzahl der an KCS erkrankten, behandelten West Highland White Terrier**

Gruppe	Medikament	Anzahl
3.1	CsA 0,2% ige Salbe	6
3.2	Tacrolimus	1
3.3	CsA 2%ige Tropfen	5

4.3.4 Elution der Tränenproteine

Die Proteine können mit Hilfe verschiedener Eluatlösungen wieder aus den Schirmer-Teststreifen herausgewaschen werden. Für diese Arbeit wurden Schirmer-Test-Streifen mit einer Gesamtlänge von 4,3 cm verwendet. In Vorversuchen mit den unterschiedlichen Lösungen, erwies sich die 70%ige Ethanol-Lösung für die Tränenproben der Hunde am geeignetsten, da sich damit bei der Messung im Massenspektrometer die geringsten Störsignale und die höchsten Intensitäten der Proteine zeigten. Um die Tränenflüssigkeit mit den Proteinen aus den Schirmer-Streifen zu lösen, wurde der STT-Streifen in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 100µl einer 70%iger Ethanol-Lösung versetzt. Bei 4°C verblieb der STT-Streifen mit der Eluatlösung für 24 Stunden im Rotationsschüttler (Fa. Bachofer, Reutlingen). Die Eluationsmittel wirken als Detergenzien und lösen die Proteine wieder aus den Streifen heraus.

70% Ethanol-Elutionslösung, vor Gebrauch frisch ansetzen:

3,5 ml Ethanol HPLC grade

1,5 ml Wasser HPLC grade

4.4 Messungen mit dem SELDI ProteinChip®

Um die Möglichkeit der Untersuchung von Hunde-Tränenproben mit Hilfe der Massenspektrometrie zu eruieren, wurden 2004 Tränenproben von 43 West Highland White Terriern mit Hilfe des SELDI-TOF-MS (surface enhanced laser desorption/ionization-Time of Flight Massenspektrometrie)-Gerätes der Firma Ciphergen untersucht. Bei SELDI handelt es sich um eine Abwandlung der MALDI-Technologie, bei der reaktive Oberflächen auf den Spots zum Einsatz kommen (HUTCHENS u. YIP, 1993). Bei den Messungen wurden Chips mit einer hydrophoben Oberfläche verwendet. Die chipgebundenen Proteine aus der zu untersuchenden Probe wurden mit sinapinsäurehaltiger Matrix versetzt, wodurch es zur

Ausbildung von Co-Kristallen kommt. Die Proteine wurden nach Ionisation durch den Laser auf ihre Masse/Ladungs-Verhältnisses hin analysiert. Im Vergleich zum MALDI ist beim SELDI eine Untersuchung über einen breiteren Massenbereich möglich, dies aber in einer geringeren Auflösung. Über die Erstellung von LIFT (laser-induced forward transfer)-Spektren und deren Abgleich mit Datenbanken, ist es mit dem MALDI zudem möglich Proteine zu identifizieren (DE BOCK et al., 2010).

Für die Untersuchung mit dem SELDI wurden die Schirmer-Streifen mit 500µl einer 1%igen Triton-Lösung (in PBS Lösung) eluiert. Es handelte sich um folgende Proben:

Tabelle 17: Anzahl der Proben die bereits im SELDI untersucht wurden

Gruppen	Anzahl Proben
1= gesunde WHWT	27
3= an KCS erkrankte, unbehandelte WHWT	8
5= an KCS erkrankte, behandelte WHWT	8

Abk.: KCS= Keratokonjunktivitis sicca, SELDI= surface enhanced Laser desorption/ionisation, WHWT= West Highland White Terrier

Diese Proben standen für eine erneute Untersuchung mit dem MALDI-Gerät nicht zu Verfügung, da die Elution mit Triton im Meßbereich des MALDI's erhebliche Störsignale verursacht und eine Auswertung unmöglich macht.

Als Matrix wurde beim SELDI Sinapinsäure in folgender Lösung verwendet:

20mg Sinapinsäure

750 µl Acetonitril

750µl Wasser HPLC grade

15µl Trifluoressigsäure

4.5 Auswahl einer geeigneten Eluatlösung für die MALDI-Messung

Es wurden drei verschiedene Eluatlösungen getestet. Es handelte sich um 70%ige Methanol-Lösung, 70%ige Ethanol-Lösung und 0,1%ige Dodecylmaltosid-Lösung.

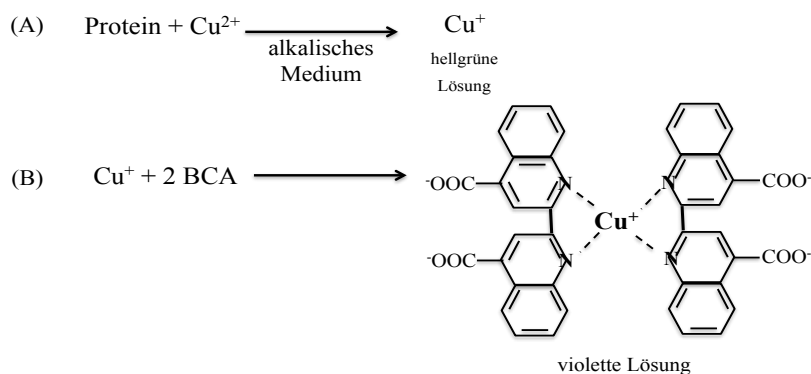
Kriterien für die Auswahl der Lösung waren, dass eine Intensität der Proteinpeaks von mindestens 800 und dabei ein möglichst geringes Hintergrundrauschen erreicht werden sollte.

Tabelle 18: Zusammensetzung der verglichenen Elutionslösungen

70% Methanol-Lösung	70% Ethanol-Lösung	0,1%ige Dodecylmaltosid-Lösung
3,5ml Methanol 1,5ml Wasser HPLC grade Vor Gebrauch frisch ansetzen.	3,5ml Ethanol 1,5ml Wasser HPLC grade Vor Gebrauch frisch ansetzen.	0,5 mg Dodecylmaltosid (0,1% w/v) 0,5 µl TFA in 500µl Wasser HPLC grade Vor Gebrauch frisch ansetzen.
Jeder Streifen wird mit 200µl Eluatlösung überschichtet. Über Nacht wird bei 10°C im Intellimixer eluiert. Am nächsten Tag können die Proben verwendet werden oder für spätere Untersuchungen im -80°C Gefrierschrank gelagert werden.	Jeder Streifen wird mit 200µl Eluatlösung überschichtet. Über Nacht wird bei 10°C im Intellimixer eluiert. Am nächsten Tag können die Proben verwendet werden oder für spätere Untersuchungen im -80°C Gefrierschrank gelagert werden.	Jeder Streifen wird mit 500µl Eluatlösung überschichtet. Über Nacht wird bei 10°C im Intellimixer eluiert. Am nächsten Tag werden die ursprünglichen 500µl Eluat im Concentrator auf 100µl eingedampft.

4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt in den gewonnenen Schirmer-Eluaten wurde mit Hilfe eines Bicinchoninsäure (BCA)-Assays bestimmt. Diese 1985 von SMITH et al. entwickelte Methode basiert auf einer kolorimetrisch nachweisbaren Farbreaktion (Abbildung 6). In der vorliegenden Arbeit wurde ein BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, USA) verwendet.

**Abbildung 6: Farbreaktion des Bicinchoninsäure-Assays (Quelle: www.piercenet.com)**

(A) Im alkalischen Medium erfolgt eine Reduktion von Cu(II) durch vorhandene Proteine zu Cu(I)

(B) Bei Komplexbildung aus Bicinchoninsäure-Molekülen und Cu(I)-Ionen kommt es zu einem Farbumschlag der Reaktionslösung von zunächst hellgrün nach violett. Dies erlaubt eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes der untersuchten Probe mittels eines UV-Spektrometers.

Durch Verdünnung von bovinem Serumalbumin (BSA) mit Wasser HPLC grade wurde eine Eichgerade erstellt. Diese BSA-Konzentrationsreihe lag im Bereich von 0-2000 µg Protein pro Mikroliter. Im Anschluss wurden jeweils 10µl der definierten BSA-Verdünnungen sowie 10µl der Schirmer-Eluate und je 190µl BCA-Reagenz in eine Mikrotiterplatte (Costar® 3595, Vitaris) gegeben und gut durchmischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank wurde die Absorption der Lösungen bei 570 nm mit dem Multiscan Ascent (Fa. Thermo Scientific, USA) gemessen. Die Proteinkonzentration der Schirmereluate wurde mit Hilfe der aus den Standardwerten erstellten Eichgerade berechnet (Ascent Software, USA).

4.7 Untersuchung der Tränenproben mit dem Massenspektrometer

4.7.1 Funktion des Massenspektrometers

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Biopolymeren. Dabei wird das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Moleküle ermittelt, um so die qualitative und quantitative Zusammensetzung einer Probe zu analysieren. Bei bekannter Ladung z kann daraus die Masse m der Teilchen ermittelt werden. Für dieses Verfahren sind nur geringe Probenmengen erforderlich. Die präzise Bestimmung der Masse eines Proteins ist einer der wichtigsten Faktoren für seine Identifikation. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird der Analyt ionisiert. Im Analysator werden die Ionen nach ihrer Masse (genauer nach dem Masse/Ladung-Verhältnis) getrennt. Der Ionendetektor wandelt die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um. Massenspektrometer werden durch den eingesetzten Analysator typisiert. Beim hier verwendeten Flugzeit-Massenspektrometer wird ausgenutzt, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und leichte Ionen deshalb schneller sind als schwere. Es wird die Flugzeit der Moleküle gemessen, die sie für eine feldfreie Driftstrecke im Hochvakuumrohr (Flugrohr) benötigen. Leichte Ionen erreichen den Detektor früher als schwere Ionen. Das Masse-Ladungs-Verhältnis m/z ist bei konstanter Flugstrecke und Beschleunigungsspannung proportional zum Quadrat der Flugzeit. Durch genaue elektronische Messung der Flugzeit lässt sich m/z sehr genau bestimmen. Der Detektor erstellt aus den einzelnen Ionensignalen (Peaks) über einen ausgewählten m/z Bereich ein komplettes Massenspektrum, in dem neben dem m/z -Wert der gebildeten Ionen auch deren relative Intensität abgelesen werden kann. Durch die Tatsache, dass nicht alle Ionen zur gleichen Zeit und am gleichen Ort desorbiert und ionisiert werden, besitzen die Ionen gleicher Masse unterschiedliche kinetische Energien und somit unterschiedliche

Geschwindigkeiten. Dies führt dazu, dass sie zu unterschiedlichen Zeiten auf dem Detektor ankommen und die Peakschärfe herabsetzen. Deshalb besitzt dieses Gerät noch einen Ionenspiegel (Reflektor), wodurch die Flugstrecke durch ein zusätzliches elektrisches Feld am Ende der ursprünglichen Flugrichtung verdoppelt wird. Mittels dieses elektrischen Gegenfeldes erfahren die Ionen eine Richtungsänderung. Zwei Ionen mit der gleichen Masse, aber unterschiedlichen kinetischen Energien dringen unterschiedlich weit in das elektrische Feld ein und müssen eine längere Strecke zurücklegen, wodurch sie das Reflektorfeld später verlassen. Aufgrund ihrer höheren Geschwindigkeit holen sie die energieärmeren Ionen gleicher Masse wieder ein, so dass sie gleichzeitig auf dem Detektor auftreffen. Durch den Reflektormodus werden die einzelnen Moleküle besser getrennt, die Auflösung erhöht und die Peakbreite verringert (LENNON, 1997).

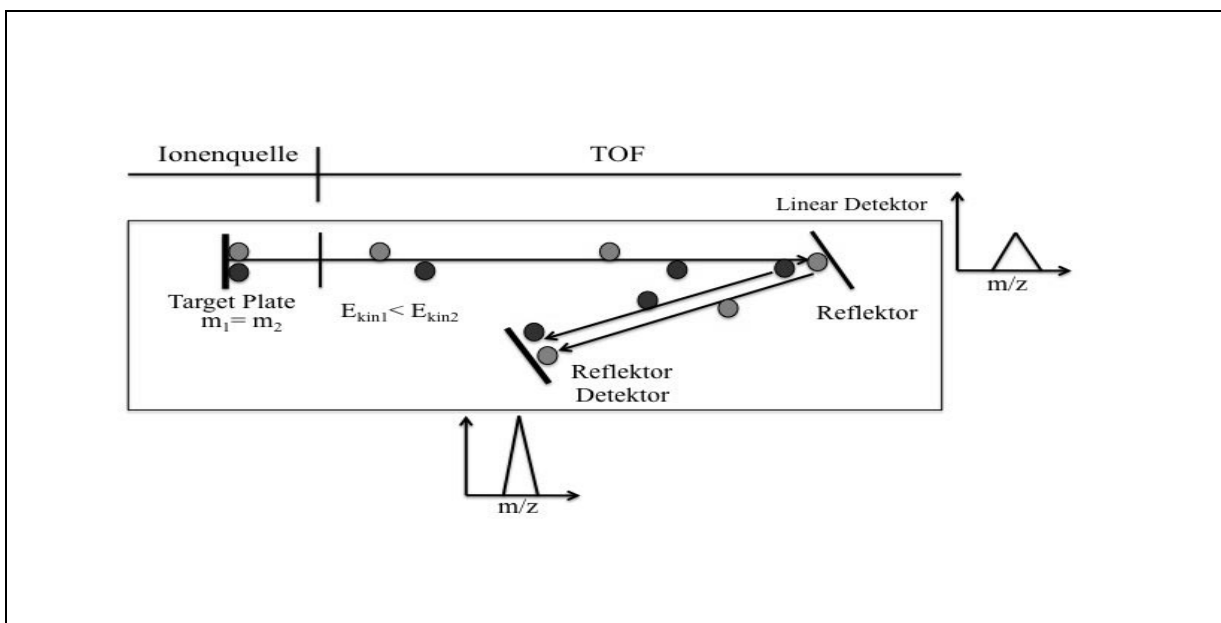


Abbildung 7: Schema der Funktionsweise des Time of Flight (TOF) Analysators mit Reflektormodus zur besseren Auflösung (Quelle: WEBER, 2006)

Grün markierte Punkte stellen Moleküle mit großer Masse dar, sie besitzen langsamere Fluggeschwindigkeit im ersten TOF-Analysator, legen eine kürzere Wegstrecke im 2. TOF-Analysator zurück und kommen mit einer schnelleren Ankunftszeit am Reflektor-Detektor an. Blau markiert sind Moleküle mit kleinerer Masse. Sie haben einen schnelleren Ionenflug im 1. TOF-Analysator, legen im Reflektormodus (dem entgegen wirkenden elektrischen Feld), verursacht durch die hohe Geschwindigkeit eine längere Wegstrecke zurück und haben dadurch eine langsamere Ankunftszeit am Reflektor-Detektor.

Nach dem Einfahren des Probensträgers in die Hochvakuumkammer wird die Probe punktuell mit kurzen hochenergetischen Laserimpulsen von 2-5ns Pulsdauer beschossen. Die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) beruht auf der Kokristallisation von Matrix

und Analyt mit einem Überschuss an Matrixmolekülen. Da die Matrixmoleküle bei der eingestrahlten Laserwellenlänge ein Adsorptionsmaximum haben, führt es nach der Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teilchenablösungen. Das so entstandene Gas aus positiv geladenen Ionen wird durch ein elektrisches Feld im Analysator beschleunigt. In der feldfreien Vakuum-Flugröhre des Flugzeit-Massenanalysators bewegen sich die Moleküle aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Ionen treffen nach einer bestimmten Flugzeit auf den Detektor des MALDI-TOF-TOF, welcher aus einer Mikrokanalplatte besteht, die den ankommenden Ionenstrom in elektrischen Strom umwandelt (LENNON, 1997; WEBER, 2006). Es folgt eine Computer-gestützte Digitalisierung zur Bestimmung von Flugzeit und relativer Intensität und die Errechnung der Masse (Bruker Daltonics, Bremen).

4.7.2 Auftragen der Proben auf den Probenträger (AnchorChip™ targets)

Wesentlich für eine MALDI-Messung sind die Probenpräparation und das Auftragen auf den Probenträger. Die AnchorChip™ targets sind mit hydrophilen Stellen (sog. Anker) und einer hydrophoben Umgebung versehen. Dadurch konnte die Sensitivität der Detektion um den Faktor 10 bis 100 erhöht werden (Bruker Daltonics, Bremen), da die Probe im Zentrum, dem Anker, konzentriert wird.

Herstellung der Matrix (aufgrund der flüchtigen Bestandteile vor Gebrauch frisch ansetzen) aus:

5ml	Acetonitril (ACN)
4,8ml	Wasser HPLC grade
200µl	Trifluoressigsäure (TFA)
20mg	Zimtsäure (CHCA)

Die Proben wurden aufgetragen, indem zunächst 0,5µl Matrix, anschließend 1µl Probe und danach noch einmal 0,5µl Matrix auf das Anchor Chip™ target pipettiert wurde. Bei dieser „Sandwich“-Methode muss jede einzelne Schicht komplett getrocknet sein, bevor die nächste Schicht aufgetragen wird, um eine gleichmäßige Kristallisation zu gewährleisten (Bruker Daltonics, 2001). Die Matrix ist ein Gemisch aus Trifluoressigsäure und kleinen UV-absorbierenden, organischen Molekülen (hier die Cyano-4-hydroxymimtsäure). Der stark saure pH-Wert der Matrix dient der Protonenübertragung und damit zur Ionisierung der Proteine bzw. Peptide. Durch die schnelle Kristallisation der Matrix wird die zu messende Probe mit in das Kristallgitter eingebaut (LOTTSPICHS u. ENGELS, 2006). Das Matrix-zu-Analyt-Verhältnis beträgt etwa 5000:1 (mol/mol). Durch diesen Überschuss an Matrix bleiben die

Analytionen intakt. Im Verlauf der Messung kommt es zur Verdampfung der Matrix und zu Desolvatisierung und Ionisierung des Analyten. Als Matrixsubstanzen werden kleine organische Moleküle gewählt, die bei der verwendeten Laserwellenlänge Energie stark absorbieren. Mit kurzen, hochenergetischen Laserpulsen von 2–5ns Pulsdauer erfolgt die Anregung, die nach Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teilchenablösungen an der Oberfläche des Kristalls führt.

4.7.3 Messung im Linear Modus

Nach der oben beschriebenen Vorbehandlung der Tränenproben wurden sie im Linear Modus des Ultraflex Massenspektrometers untersucht. Das Gerät wurde zunächst durch Messung von Kalibrationsspots mit Peptidstandard (1µl Peptidstandard MS mit 9µl Matrix) kalibriert. Der Meßbereich lag im Bereich von 1000 bis 5000 Dalton. Die Messung wurde mit einer Laserintensität zwischen 15-25µJ durchgeführt. Es wurden viermal 100 Schuss aufsummiert. Die Messungen wurden mit der eingestellten Meßmethode von Flex Control vollautomatisch durchgeführt.

4.7.4 Messung im Reflektor Modus- Biomarkersuche

Auch bei dieser Einstellung wurde im Massenbereich von 1000-5000 Dalton gemessen. Um die im Linearmodus gefunden Peptide oder die zugehörigen Proteine identifizieren zu können wurden im Reflektormodus aus den spezifischen Fragmentierungsmustern so genannte LIFT (LIFT= laser-induced forward transfer)-Spektren erstellt. Aus den gewonnenen LIFT-Spektren kann eine Proteinsuchsoftware (hier BioTools) die Sequenz der Peptide errechnen, die mit den Datenbanken abgeglichen wird. Die interessanten Peptide wurden einzeln fragmentiert. Eines der Peptide wurde ausgewählt und in der ersten TOF-Einheit von den anderen Peptiden getrennt und durch ein Ionengatter selektiert. Durch eine sogenannte LIFT - Einheit im Strahlengang ist es möglich das gesuchte Peptid („Parention“) von dessen auftretenden Fragmenten zu trennen. Die Fragmente fliegen mit der selben Geschwindigkeit wie das „Parention“ durch das Flugrohr, besitzen allerdings eine geringere kinetische Energie, wodurch sie normalerweise im Reflektor so abgelenkt werden, dass nur Ionen mit mindestens 70% der kinetischen Energie des „Parention“ auf den Detektor treffen. Durch die LIFT-Einheit werden die Fragmente jedoch so energetisch aufgeladen, dass sie ebenfalls auf den Detektor treffen können. Es ist so möglich das „Parention“ zusammen in einem Spektrum zu detektieren. Die Messung wurde mit einer Laserintensität zwischen 15-25µJ durchgeführt Für den Parentpeak wurden fünfmal 50 Schuss aufsummiert. Um die LIFT Spektren zu erstellen wurde auf 2200 Schuss aufsummiert. Die Messungen wurden mit der eingestellten

Meßmethode von Flex Control vollautomatisch durchgeführt. Die im Reflektor-Modus gemessenen Peptidfragmente resultieren bevorzugt aus Brüchen im Peptidrückgrat. Aus den einzelnen Peaks eines LIFT Spektrums lässt sich eine Peptidleiter des Parentions gewinnen und so seine Sequenz. Die gewonnen LIFT-Spektren sind sehr komplex, was eine Sequenzierung per Hand sehr zeitaufwendig macht und die Sequenzierung deshalb anhand eines Datenbankenabgleichs geschehen sollte, wie er durch Mascot möglich ist. Das Vergleichen von Proteinmustern und das Auffinden von signifikanten Biomarkern werden als Biomarkerprofiling bezeichnet. Durch die Möglichkeit im MALDI-TOF-TOF die Peptidmuster eines Proteins zu analysieren und die Aminosäuresequenz der einzelnen Peptide zu bestimmen können mittels Datenbankabgleich Proteine identifiziert werden.

Um die Intensität der in der Probe vorhandenen Proteine zu erhöhen und die Identifizierung durch das Liften zu ermöglichen, wurden verschiedene Aufreinigungen durchgeführt.

4.8 Aufreinigung der Probe durch Aceton-Fällung

Das Fällen von Proteinen ist eine weitverbreitete Möglichkeit, um Proteine von einer Lösung zu trennen. Dies kann zum Aufreinigen von Proteinen oder zum Entfernen von Proteinen aus der Lösung und zum Aufkonzentrieren von niedermolekularen Analyten verwendet werden. Der Mechanismus der Proteinfällung beruht auf der Veränderung des Lösungsvermögens des verwendeten Lösungsmittels. Bei diesem Versuch der Konzentrationserhöhung wurde der Schirmer-Tränen-Test-Streifen nicht mit einer 70%igen Ethanol-Lösung eluiert, sondern mit 500µl einer 0,1% Dodecylmaltosid-Lösung. Die überschichteten Streifen wurden über Nacht gekühlt bei 10°C im Intellimixer eluiert. Nach Entfernen der Schirmer Streifen wurde das gewonnene Eluat in der Speedvac-Zentrifuge bis auf 100µl eingedampft. Das verbliebene Eluat wurde in ein neues Reaktionsgefäß verbracht und mit 400µl eiskaltem Aceton überschichtet. Über Nacht erfolgte die Fällung der Proteine bei -80°C im Gefrierschrank. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgefäß mit Inhalt zwei Stunden bei 15000xg und 4°C zentrifugiert (Fa. Heraeus Instruments). Nach zwei Stunden konnte das entstandene proteinhaltige Pellet mit einer Pipette aufgenommen werden. Der proteinarme Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in einem neuen Reaktionsgefäß in 10µl Wasser HPLC grade gelöst und auf einen MALDI Probenträger zur weiteren Untersuchung aufgetragen.

4.9 Aufreinigung der Proben mit Dynabeads® RCP18

Die Auftrennung mit Hilfe von C18-Beads basiert auf den Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und der Oberflächen der Beads. Die Peptide binden durch auf der Oberfläche der Beads vorhandenen hydrophoben Liganden an die RCP 18 Beads. Diese Interaktion ist so stark, dass sie nur durch starke organische Lösungsmittel wie Acetonitril wieder gelöst werden kann. Durch die magnetische Eigenschaft der Beads können die gebunden Peptide leicht von der Lösung getrennt werden. So ist eine Trennung der Peptide von denen in der massenspektrometrischen Untersuchung störenden Tränenfilmbestandteilen, wie den Salzen oder den für die Eluation benötigten Chemikalien möglich. Dies verbessert die Qualität der Spektren erheblich und dient auch der Anreicherung der Peptide. Die Beads werden als Suspension in Ethanol gelagert. Vor der Verwendung müssen die Beads zunächst davon getrennt werden. Durch vorsichtiges Schütteln lässt sich eine gleichmäßige Suspension herstellen. Davon werden 20µl pro Tränenprobe in ein Reaktionsgefäß (PCR-Tube) und in den magnetischen Halter gegeben. Der Überstand wird abpipettiert, die Beads werden dabei vom Magnet an der Tubenwand gehalten. Die Beads werden durch Zugabe von 100µl 0,1%igen TFA-Lösung und Resuspension und erneutem Verbringen in den Magneten gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nun erfolgt die Adsorption der Peptide an die Beads. Die Beads wurden mit 10µl des Eluats und 15µl einer 0,1%igen TFA-Lösung versetzt, vermischt und für zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit Hilfe des Magneten vom Lösungsmittel getrennt. Dieser Überstand wurde aufgehoben. Nun wurden die Beads mit 50µl 0,1%iger TFA-Lösung gewaschen. Das Waschen erfolgte wie oben beschrieben und wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Alle Überstände wurden aufgehoben. Die Ablösung der Peptide erfolgte mit 6µl einer 50%iger Acetonitril-Lösung. Nach zweiminütiger Inkubation wurde der Überstand mit Hilfe des Magneten abpipettiert. Die einzelnen Waschschrift und der Ablöseschrift wurden einzeln auf ein Target aufgetragen und massenspektrometrisch untersucht. Die gesuchten Peptide fanden sich im ersten Waschschrift. In Kombination mit einem Bruker Steel™ -Target konnte genügend hohe Intensität für die Erstellung von LIFT-Spektren erreicht werden.

4.10 Auswertung der Messungen

Die Messungen der Proteingehalte der Eluate mit dem Multiscan Ascent wurden mit der Ascent Software, Version 2.6 der Firma Thermo Electron Corporation, Dreieich ausgewertet.

Beim SELDI-TOF-MS wurden die Untersuchungen mit der Ciphergen ProteinChip® Software 3.2.0 sowie der CiphergenExpress™ Client 3.0 durchgeführt.

Die Messungen mit dem MALDI-TOF-TOF wurden mit der FlexControl Software der Firma Bruker durchgeführt. Um die gewonnenen MALDI-Rohspektren vergleichbar und auswertbar zu machen, mussten sie mit der eigens dafür entwickelten PSP (Proteomic Software Project) Software prozessiert werden (TSCHÖRNER, 2008). Die Spektren der einzelnen Proben zeigen ein unterschiedliches Grundrauschen, bedingt durch die zugesetzten Chemikalien, die Behandlung der Proben und auch den Meßvorgang. Es erfolgte eine Baseline Subtraktion um die Nulllinie festzusetzen. Dabei wurde ein Schwellenwert definiert, um Peaks mit niedriger Intensität nicht in die Auswertung mit einzubeziehen. Die PSP Software wurde auch verwendet, um mit Hilfe eines Algorithmus automatisch Peaks zu detektieren, die Spektren zu normalisieren und um eine Peak Cluster Liste zu erstellen. Um die Unterschiede der Peakintensitäten zwischen den Spektren zu berücksichtigen, erfolgt die Normalisierung. Dabei wird ein Mittelwert aus allen am Detektor aufgetroffenen Ionen errechnet und jedes einzelne Spektrum auf diesen Ionenquotienten angeglichen. Nach manueller Einteilung der Gruppen in gesund, erkrankt und behandelt, wurden die Peaks die häufiger als in 20% Prozent der Spektren vorkamen zu einem Cluster zusammengefasst. Die Clusterliste enthält die Intensitäten der jeweiligen Peaks für jeden Patienten. Aus den Informationen über Gruppe, Cluster und Intensität wurde eine Matrix erstellt und in Statistica 8.0 (StatSoft®, Hamburg) überführt. Basierend auf diesen normalisierten Peakintensitäten wurden p-Werte ermittelt und Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Mit diesem Verfahren kann man untersuchen, ob sich die Intensitäten der Proteine zwischen den Gruppen im Mittel unterscheiden. Dadurch kann ermittelt werden, ob zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Man berechnet zunächst die beobachtete Varianz in den Gruppen (BURKSCHAT et al., 2004). Dazu fasst man alle Messwerte aus einer Gruppe zusammen, errechnet den Mittelwert und die Varianz. Um das Vorhandensein signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen zu prüfen, wurde der t-Test mit Tukey-HSD-Adjustierung durchgeführt. Dabei wurden p-Werte $<0,05$ als signifikant eingestuft. Ergebnis dieser Analysen ist eine Liste der möglichen Biomarker, die für eine weitere Untersuchung dienen können.

Die deskriptive Statistik erfolgte anhand von linearen Diagrammen und Box-Plots. Der Box-Plot besteht aus einem Rechteck, indem die 25-75% der Daten liegen. Das kleine Quadrat markiert den Median-Wert. Die Linien, die das Rechteck verlängern zeigen die Streuung an, indem sie die kleinsten und die größten Intensitäten anzeigen, die in den Proben vorkamen.

5 ERGEBNISSE

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Arbeit dargestellt. Detaillierte Beschreibungen der Versuchsdurchführungen, sowie alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind unter Kapitel 4.1 in Material und Methoden beschrieben. Die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse folgt in Kapitel 6.2.

5.1 Untersuchung der Proben mit dem SELDI-Massenspektrometer

Bei der Untersuchung der Hundetränenproben mit dem SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionisation)-Massenspektrometer konnten beim augengesunden Hund Intensitäten nachgewiesen werden, die denen der Haupttränenproteine beim Mensch entsprechen (Abb. 8) Bei den unbehandelten, an KCS erkrankten WHWT zeigte sich eine deutliche Reduktion in Intensität und Vorkommen der Haupttränenproteine. Nur das Lysozym war weiterhin nachweisbar (Abb.9).

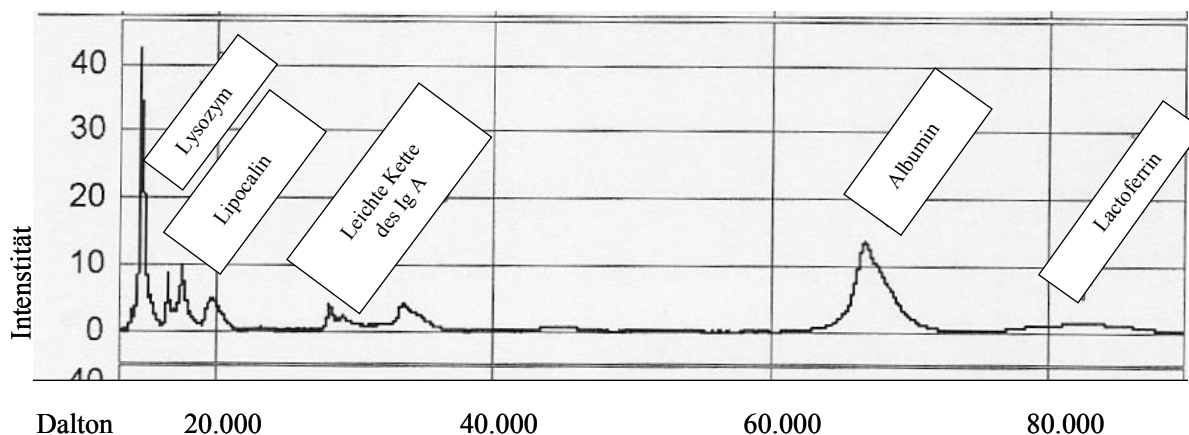


Abbildung 8: SELDI Rohspektrum eines gesunden Hundes

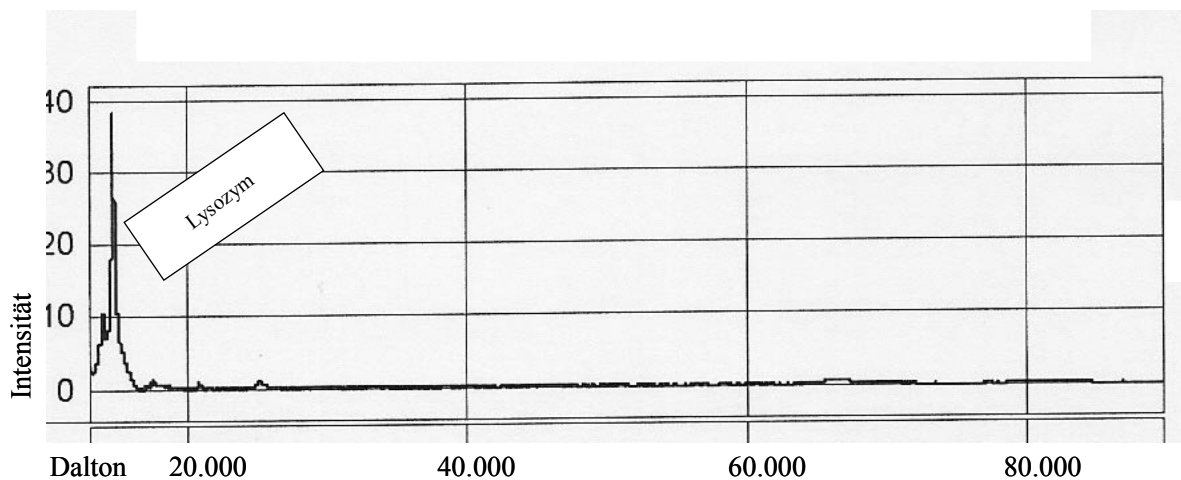


Abbildung 9: SELDI Rohspektrum eines unbehandelten, an KCS erkrankten Hundes

Ein Hund zeigte ein vermindertes Schirmer-Tränen-Test Ergebnis von 7mm/Min, war dabei klinisch aber unauffällig. In der Untersuchung mit dem SELDI fanden sich schon verminderte Intensitäten von Lysozym, Lipocalin und Album, während die leichte Kette des Immunglobulin A und das Lactoferrin nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 10).

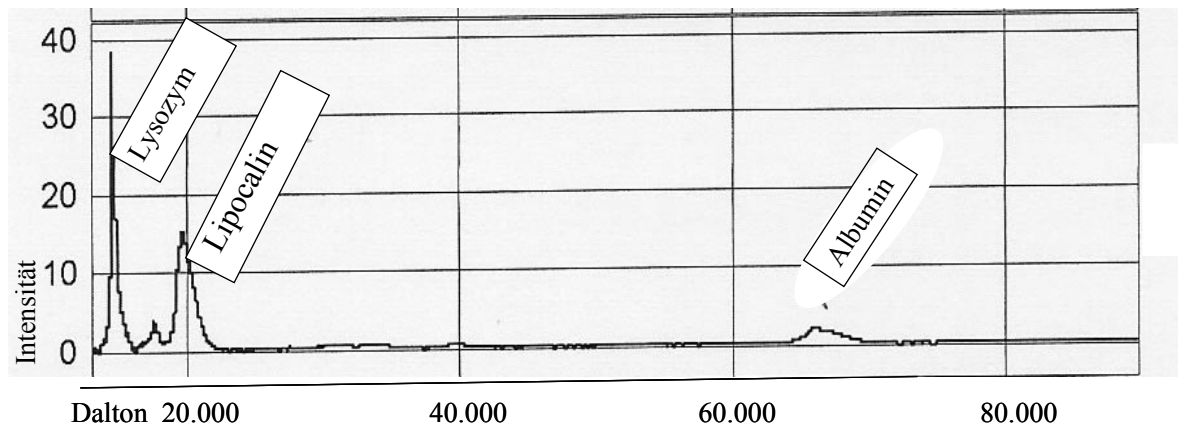


Abbildung 10: SELDI Rohspektrum eines klinisch augengesunden Hundes, aber mit vermindertem STT I Ergebnis

5.2 Wahl der Elutionslösung

Um eine geeignete Elutionslösung für die Tränenproteine in den Schirmer-Streifen zu finden, wurden drei verschiedene Lösungen getestet. Schirmer-Tränen-Test Streifen eines Hundes wurden mit den verschiedenen Elutionslösungen versetzt und in der MALDI-Messung auf ihr Ergebnis hin verglichen.

Kriterien für die Auswahl der geeigneten Elutionslösung waren, dass eine Intensität der Proteinpeaks von mindestens 800 und dabei ein möglichst geringes Hintergrundrauschen erreicht werden sollte. Im Vergleich der drei verschiedenen Elutionslösungen zeigte Ethanol das beste Ergebnis und wurde daher für diese Untersuchung ausgewählt.

In Abbildung 11 sind die Rohspektren der verwendeten Elutionslösungen im Vergleich dargestellt.

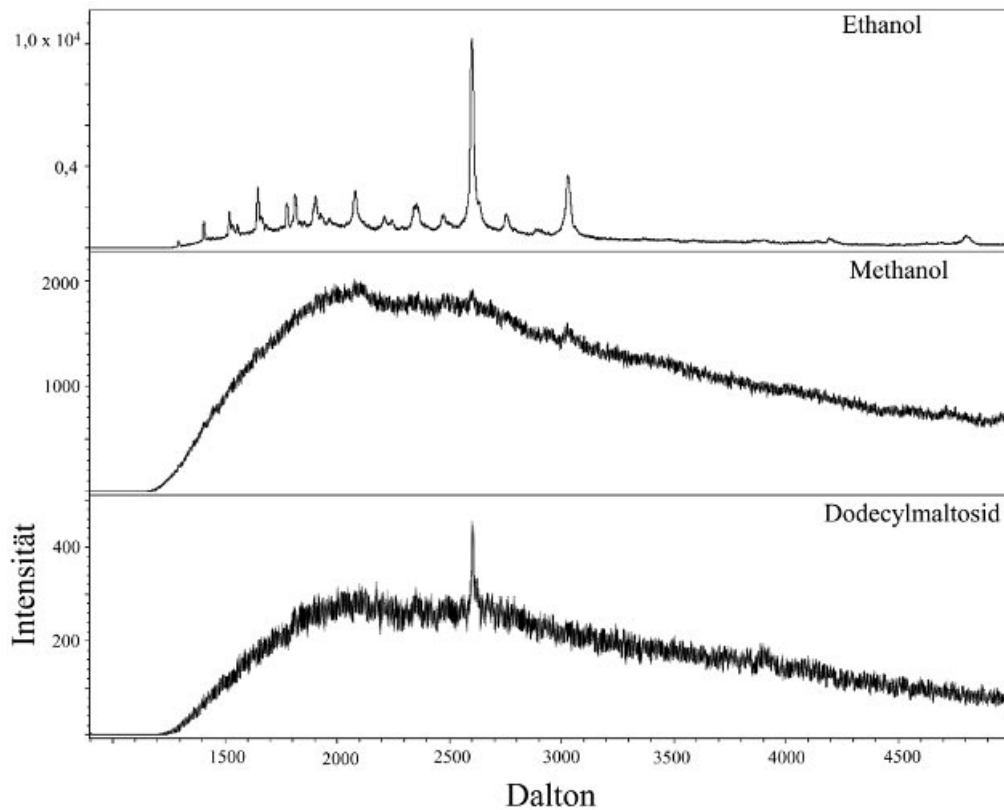


Abbildung 11: Rohspektren der verschiedenen Elutionslösungen in der MALDI-Messung

5.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Durch ein Bicinchoninsäure-Assay wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Schirmereluate mit Hilfe der aus den Standardwerten erstellten Eichgeraden berechnet. Tabelle 19 zeigt den Proteingehalt der verschiedenen Elutionslösungen bei weiblichen und männlichen Tieren und Tabelle 20 den Proteingehalt in der Ethanol-Elutionslösung im Vergleich von männlichen und weiblichen Tieren.

Tabelle 19: Ermittelter Proteingehalt in Tränenflüssigkeit von Hunden nach Verwendung verschiedener Elutionslösungen

Eluatlösung	Weiblich	Männlich
70%iges Ethanol	0,103µg Protein/µl	0,105µg Protein/µl
0,1%iges Dodecylmaltosid	0,2µg Protein/µl	0,24µg Protein/µl

Abk.: µg= Mikrogramm, µl= Mikroliter

Tabelle 20: Proteingehalt in den Tränenfilmproben eluiert mit Ethanol von männlichen und weiblichen Tieren

	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	µg Protein pro µl	MW µg Protein pro µl
Weiblich	0,226	0,138	0,056	0,445	0,084	0,203	0,107	0,179± 0,122
Männlich	0,165	0,263	0,406	0,109	0,353	0,674	0,534	0,357± 0,337

Abk.: µg= Mikrogramm, µl= Mikroliter, MW= Mittelwert

Die Schwankungen der Messergebnisse waren erheblich. Die Werte in Tabelle 19 zeigen die ersten Messergebnisse, die erfolgten um eine Elutionslösung auszuwählen.

Aus diesen Proben konnte durch Dodecylmaltosid mehr Protein wieder herausgelöst werden. Da allerdings die Auswertbarkeit der MALDI-Messungen durch Dodecylmaltosid deutlich erschwert wird, wurden alle weiteren Proben mit der Ethanol-Lösung eluiert.

5.4 Messung der Proben mit dem MALDI-TOF

5.4.1 Linear-Modus

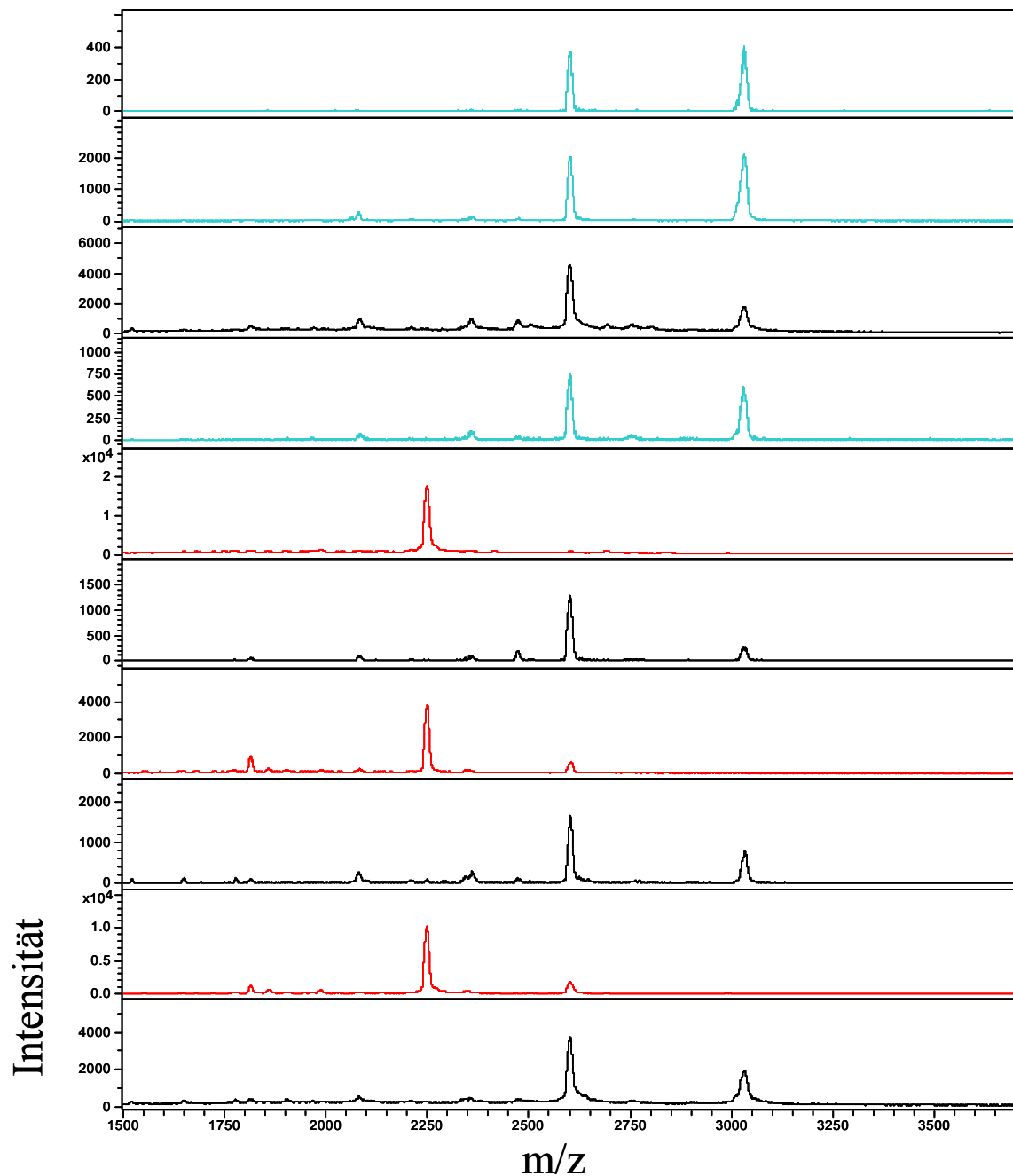


Abbildung 12: Rohspektren aus dem MALDI-TOF

Schwarz= gesunde WHWT, Rot= erkrankte, unbehandelte WHWT, Türkis= erkrankte, mit CsA behandelte WHWT

Durch die Messung im Linearmodus stellten sich bei den Hundetränen die Peptide bei 2200 Dalton, 2600 Dalton und 3000 Dalton als besonders auffällig heraus.

5.4.2 Bearbeitung der Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Fragestellung bearbeitet werden. Eine genaue Aufstellung findet sich in Kapitel 3.

Bei der Überprüfung der MALDI-Messergebnisse zeigte sich, dass von einigen Hunden nicht beide Proben, das heißt von rechtem und linkem Auge, mit in die Auswertung einbezogen werden konnten.

Um zu klären, ob es Unterschiede bei den Proben von rechtem und linkem Auge gibt, wurden die Proben der Tiere, von denen beide Proben auswertbar waren, mit Hilfe der SPSS gepaart, verglichen. Da nicht von einer Normalverteilung der Proben ausgegangen werden konnte, wurde ein Willcox-Test durchgeführt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben von rechtem und linkem Auge (p-Wert= 0,93).

Beim Vergleich der Proben von rechtem und linkem Auge im Programm Statistika, wurde ein zufällig ausgewähltes Auge pro Tier verwandt, um Proben von Tieren von denen beide Augen verwendbar waren, nicht stärker zu berücksichtigen und um nicht übermäßig rechte oder linke Augen zu verwenden. Es konnten 41 Proben von rechten Augen und 40 Proben von linken Augen von 81 Tieren für den Vergleich zwischen den Proben der beiden Augen ausgewertet werden.

Die Darstellung erfolgte im sogenannten Liniendiagramm, in welchem die Mittelwerte der untersuchten Proben bei den Daltonzahlen grafisch dargestellt werden. Die Darstellung im Liniendiagramm wird stark durch Ausreißer beeinflusst. Als Ausreißer werden alle Messungen definiert, die mehr als den 3,5-fachen Quartilsabstand vom jeweiligen Median entfernt sind.

Die Mittelwerte der Intensitäten von rechtem und linkem Auge im MALDI-TOF sind in Abb.13 in Form eines Liniendiagramms dargestellt.

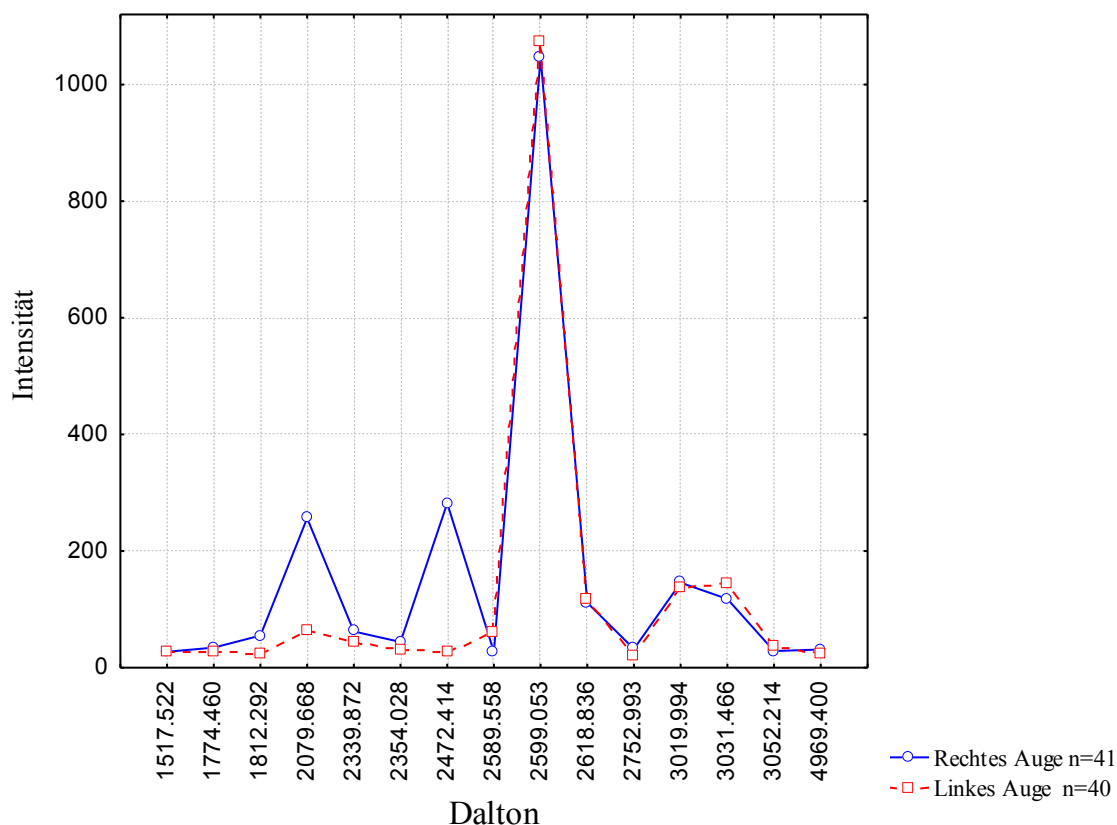


Abbildung 13: Vergleich der Mittelwerte der Tränenfilmproteinintensitäten der Proben von rechten und linken Augen von gesunden Hunden (n= 81) ermittelt durch MALDI-TOF

Die Hauptintensität liegt bei beiden Augen in dem hier gewählten Meßbereich von 1000 bis 5000 Dalton im Molekulargewichtsbereich von 2599 Dalton.

Die Abweichungen bei 2079 und 2472 Dalton sind durch je einen Ausreißer bedingt. Der Verlauf ist im Mittel vergleichbar. Signifikante Unterschiede zwischen den Proben von rechten und linken Augen konnten nicht gefunden werden ($p= 0,16$ bei 2599 Dalton).

Die ermittelten Rohdaten sind im Streuungs-Diagramm mithilfe von Dreiecken und zur besseren Übersichtlichkeit versetzt dargestellt. Die umrahmenden Kästen zeigen die Spannweite der gemessenen Werte an, wobei die obere Kante den höchsten und die untere Kante den niedrigsten Wert anzeigt.

Der Median halbiert eine Verteilung und ist der Wert über und unter dem 50% der Werte liegen. Der „Gruppen-Median“ zeigt den für jede Gruppe errechneten Median. Beim „Gesamt-Median“ wird der Median für alle Messwerte insgesamt, also ohne eine Differenzierung nach Gruppen angegeben.

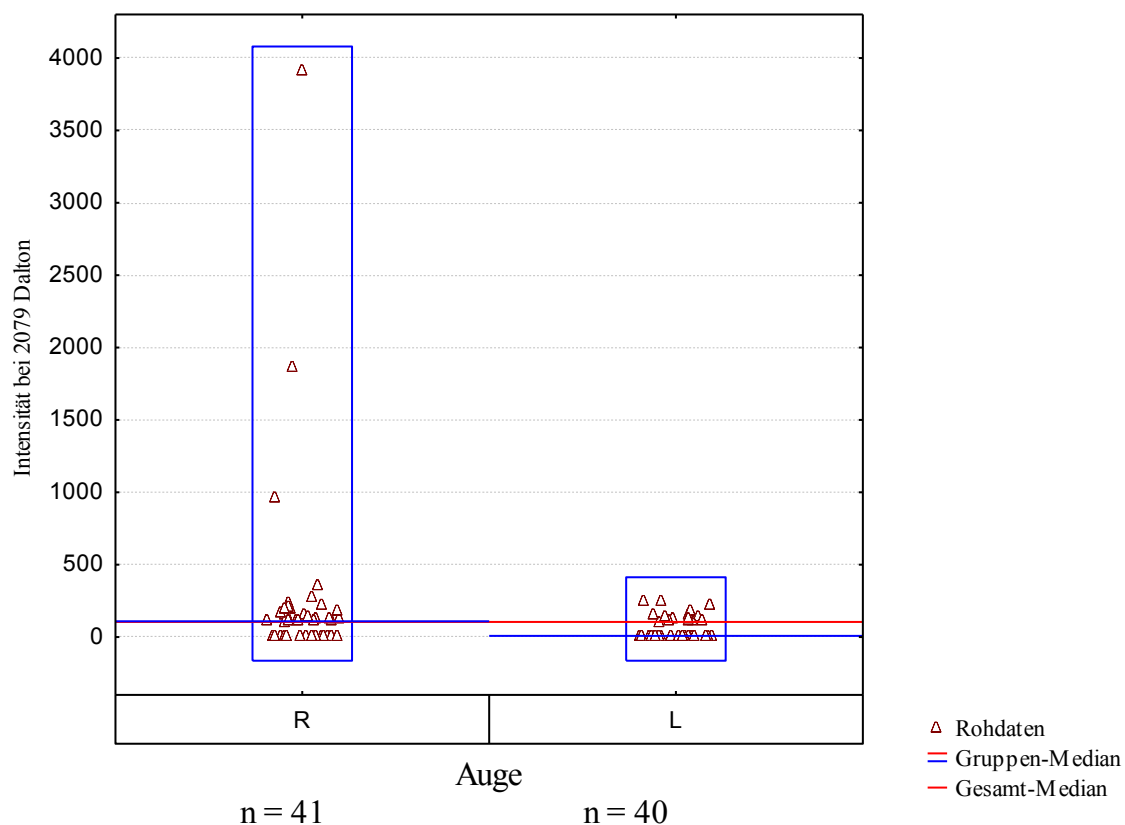


Abbildung 14: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2079 Dalton

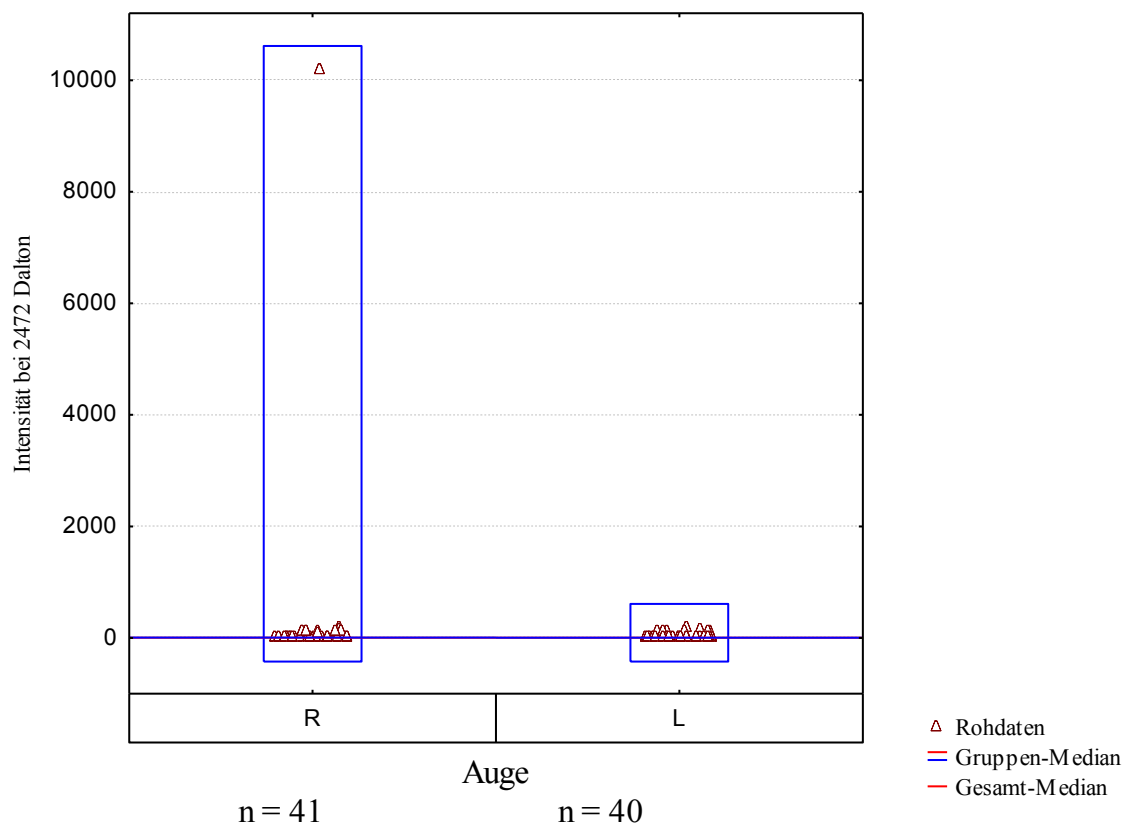


Abbildung 15: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2472 Dalton

Für die weitere Auswertung und die Bearbeitung der in Kapitel 3 genannten Fragestellungen wurden neben den oben beschriebenen ausgewählten Proben, von Tiere von denen beide Proben verwendbar waren, zusätzlich auch die Proben der Hunde verwendet, bei denen nur eine Probe auswertbar war.

Es konnten 118 Proben von 118 Tieren verwendet werden. Es handelt sich um Proben von 39 männlichen, 18 männlichen, kastrierten Hunden sowie 25 weiblichen und 36 weiblichen, kastrierten Hunden.

Um die Veränderungen der Tränenfilmproteine in Beziehung zum Alter der Tiere zu betrachten wurden sie in Altersgruppen eingeteilt. Hunde im Alter von 0 bis 5 Jahren wurden in die Gruppe 5, solche von 6 bis 10 Jahren in die Gruppe 10 und alle Hunde über 11 Jahren in die Gruppe 15 eingeteilt. Die Anzahl der Tiere in den verschiedenen Gruppen ist in den Tabellen 14, 15 und 16 in Kapitel 4.3.3 dargestellt.

1. Bestehen Unterschiede bei der Proteinverteilung in den Tränen von gesunden WHWT im Vergleich zu anderen Hunderassen und Mischlingen ?

Es wurden Tränenproben von 29 gesunden West Highland White Terriern, 14 Staffordshire Terriern, sieben Deutschen Schäferhunden, fünf Labradoren, 22 Mischlingen und 41 anderen Rassen verwendet.

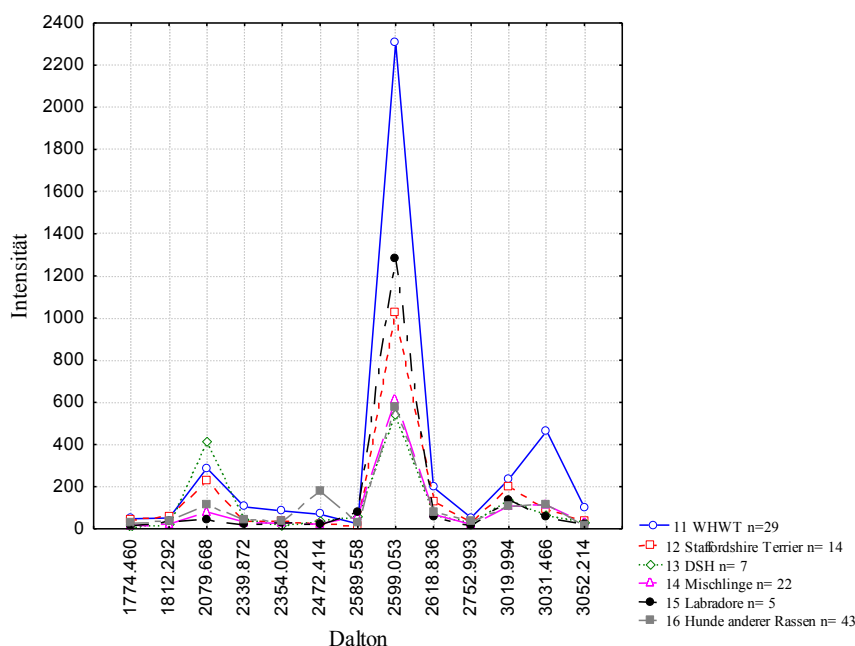


Abbildung 16: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten von verschiedenen Hunderassen gemessen mit MALDI-TOF

Der Verlauf der Intensität der Tränenfilmproteine ist in diesem Vergleich bei den verschiedenen Rassen sehr ähnlich. Die Abweichung bei 2079 Dalton ist durch Ausreißer bedingt. Signifikante Unterschiede zwischen den Rassen konnten weder bei 2079, 2472 noch bei 3031 Dalton gefunden werden. Bei 2599 Dalton zeigen sich allerdings signifikante Unterschiede in der Intensität zwischen WHWT und Mischlingen ($p= 0,02$), sowie zwischen WHWT und Hunden anderer Rassen ($p= 0,001$) (Abbildung 16). Problematisch in der Beurteilung sind die sehr unterschiedlichen Gruppengrößen. Das Protein bei 2599 Dalton zeigt bei allen Rassen im Mittel die höchste Intensität. Die signifikanten Unterschiede bei 2599 Dalton könnten auch durch die unterschiedlichen Gruppengrößen und die vorhandenen Ausreißer bedingt sein.

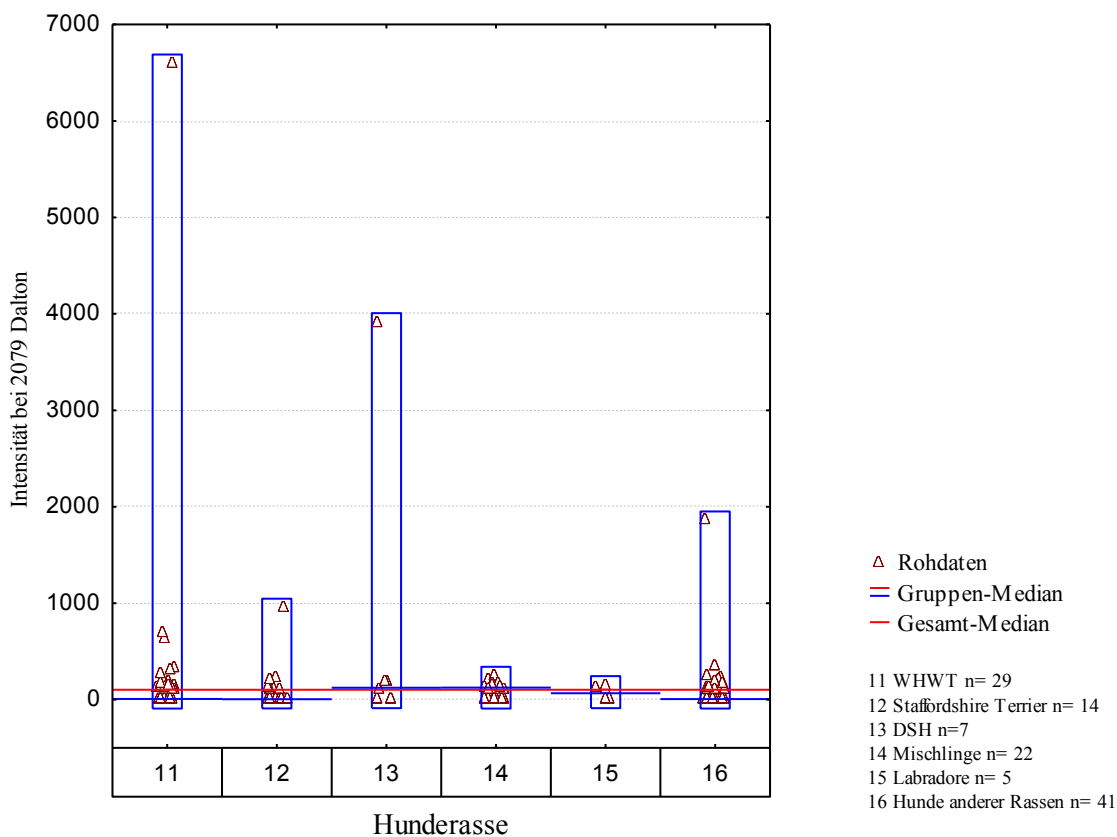


Abbildung 17: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2079 Dalton

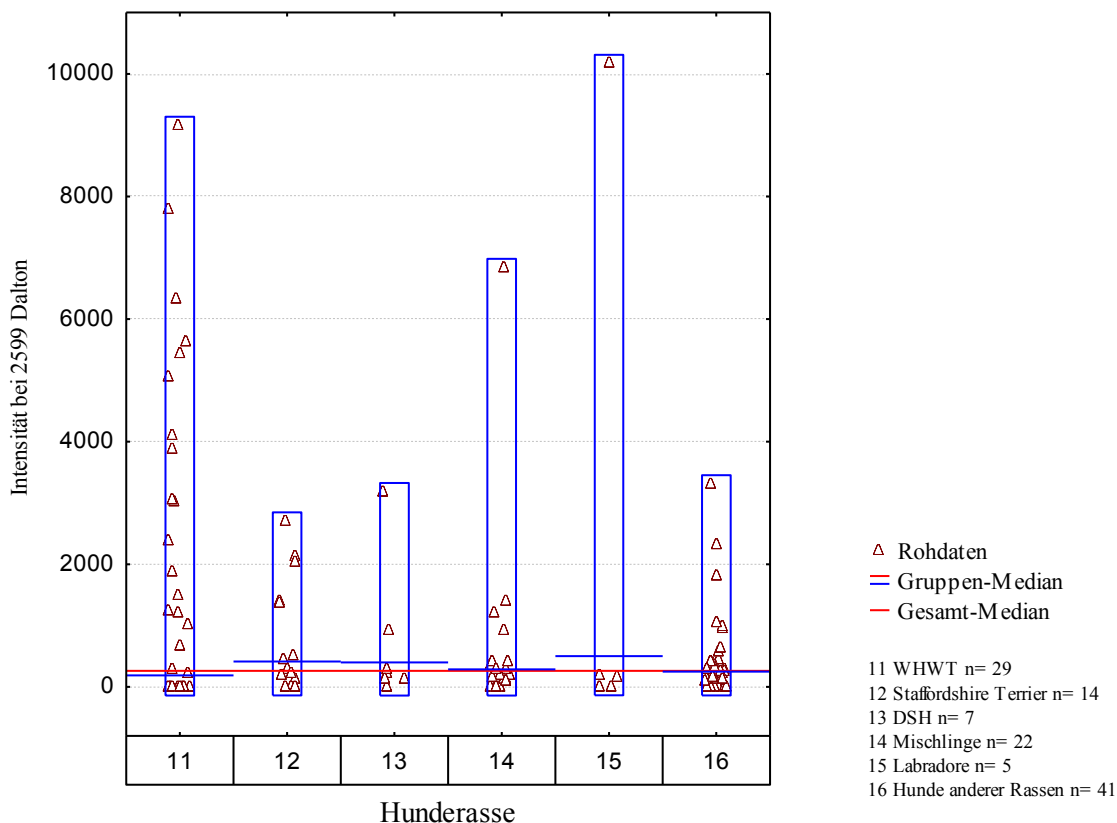


Abbildung 18: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

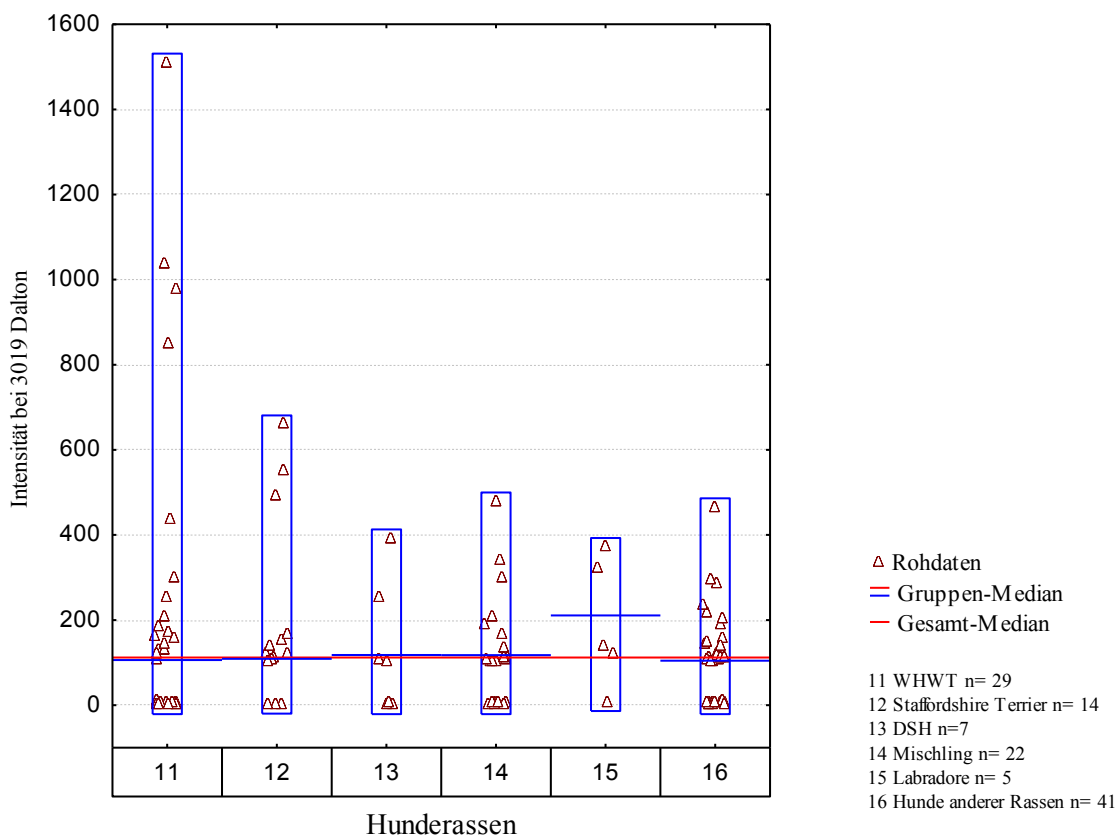


Abbildung 19: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 3019 Dalton

	{1} - M=2203,0	{2} - M=815,07	{3} - M=690,43	{4} - M=589,18	{5} - M=2099,8	{6} - M=434,78
11 {1}		0,172080	0,346183	0,022523	0,999997	0,001316
12 {2}	0,172080		0,999990	0,999135	0,740977	0,983253
13 {3}	0,346183	0,999990		0,999995	0,760102	0,999363
14 {4}	0,022523	0,999135	0,999995		0,533439	0,999553
15 {5}	0,999997	0,740977	0,760102	0,533439		0,370764
16 {6}	0,001316	0,983253	0,999363	0,999553	0,370764	

Abbildung 20: Berechnung der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Intensitäten des Peaks bei 2599 Dalton der verschiedenen Rassen mittels Tukey HSD Test

2. Zeigen sich in der Kontrollgruppe aus gesunden Hunden verschiedener Rassen und Mischlingen Unterschiede der Proteinverteilung zwischen den Geschlechtern ?

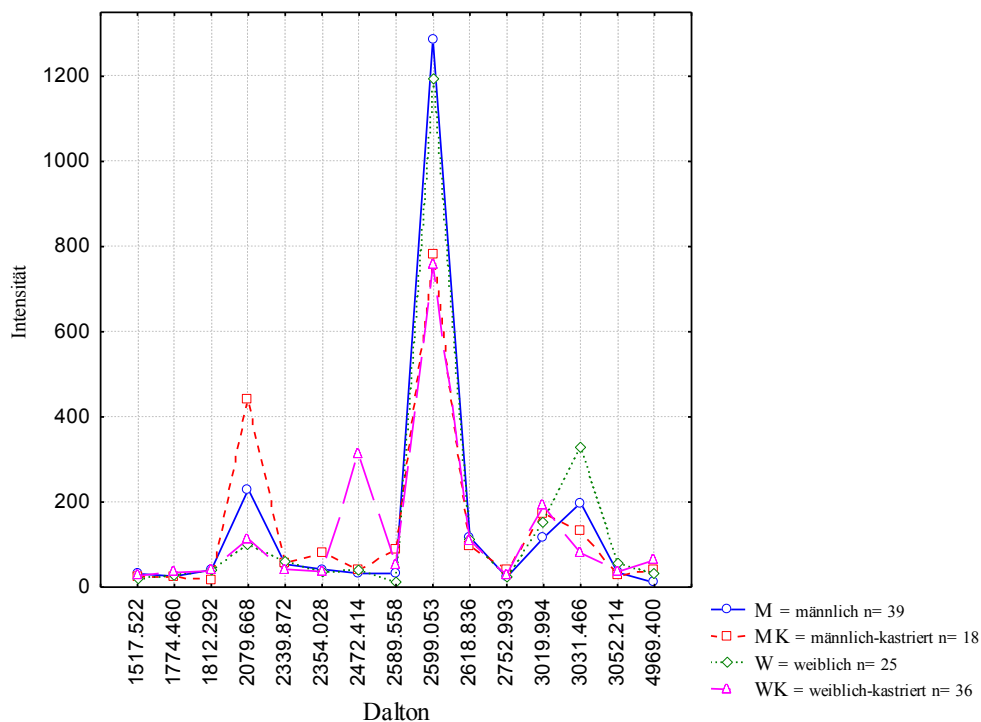


Abbildung 21: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten bei gesunden Hunden in Abhängigkeit vom Geschlecht gemessen mittels MALDI-TOF

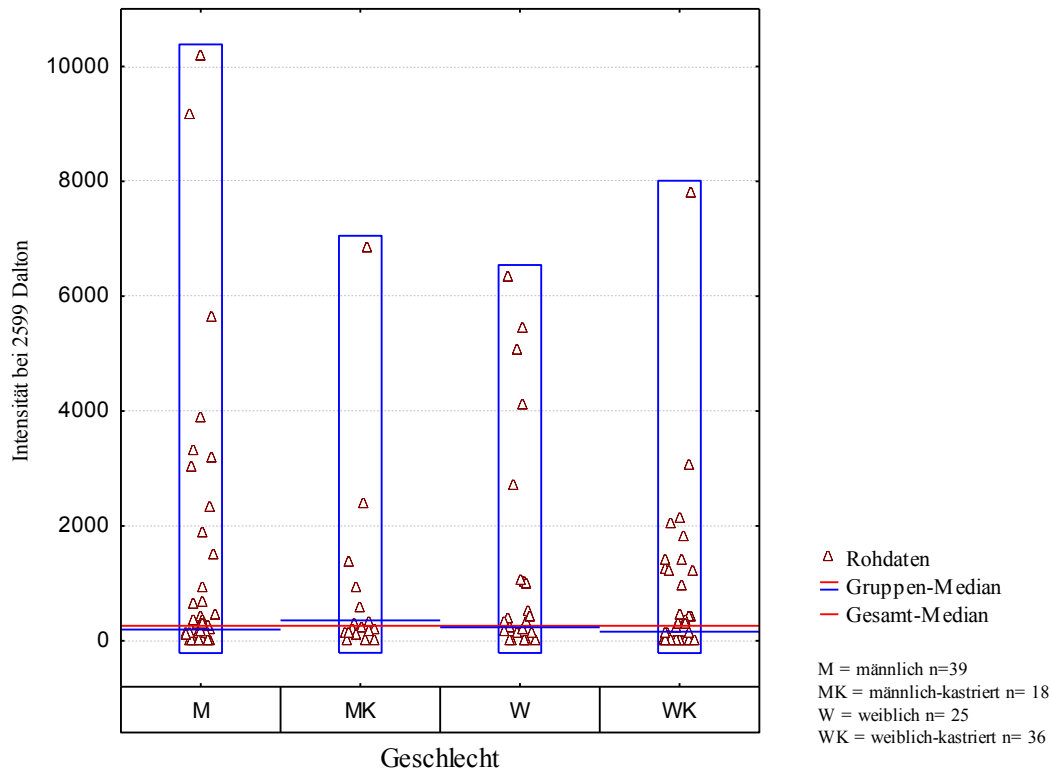


Abbildung 22 Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

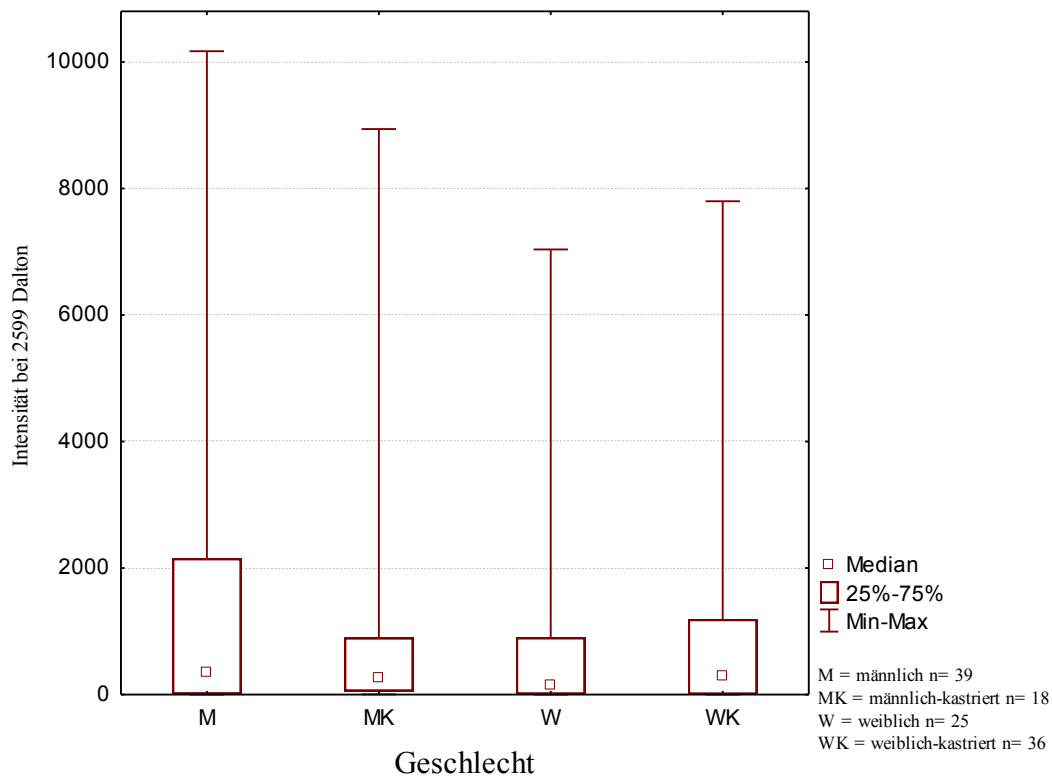


Abbildung 23: Box Plot der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechter-Gruppen konnten nicht berechnet werden. Die Abweichungen im Liniendiagramm sind durch Ausreißer bedingt. Die höchsten Intensitäten finden sich erneut bei 2599 Dalton.

3. Zeigen sich in der Kontrollgruppe aus gesunden Hunden verschiedener Rassen und Mischlingen Unterschiede in der Proteinverteilung zwischen den Altersgruppen?

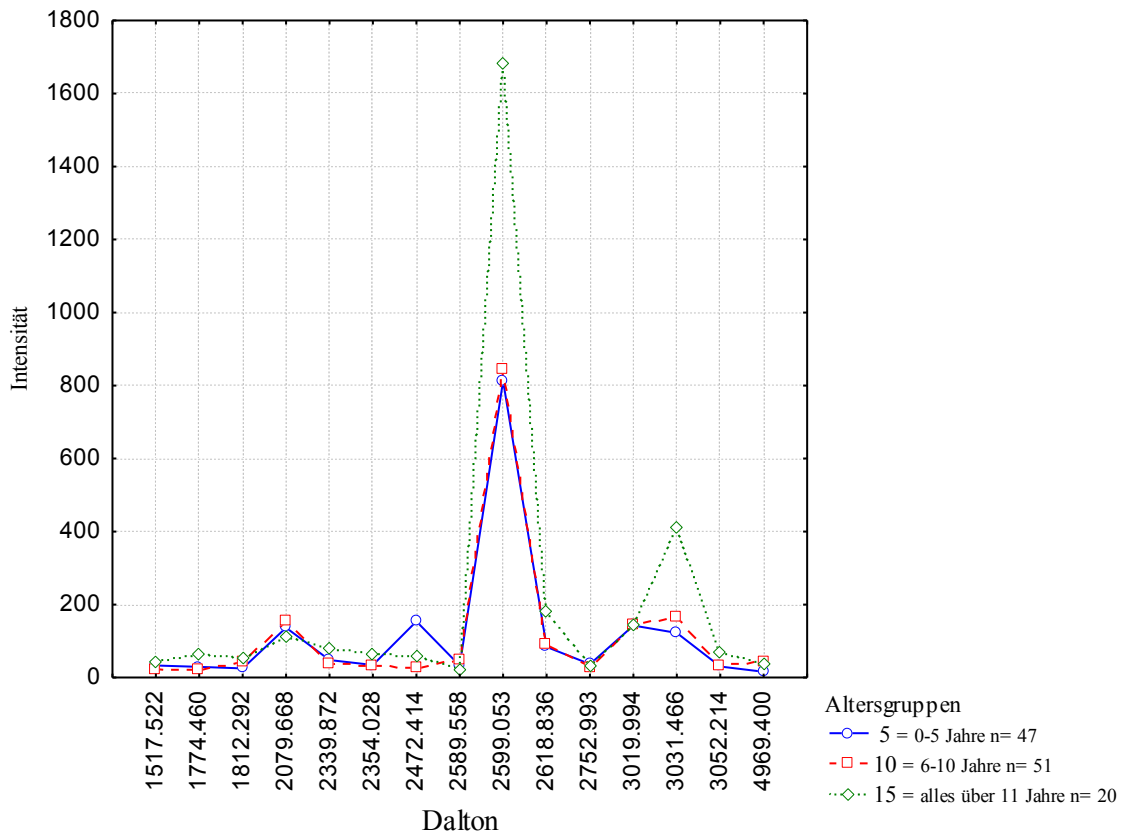


Abbildung 24: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten gemessen mittels MALDI-TOF bei gesunden Hunden in Abhängigkeit vom Alter

Mit Hilfe der statistischen Berechnung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen berechnet werden.

4. Wie verändern sich die Tränenfilmprotein-Profile bei an Keratokonjunktivitis sicca erkrankten West-Highland-White-Terriern?

Bei den an Keratokonjunktivitis sicca erkrankten, unbehandelten West Highland White Terriern waren nur fünf Tränenproben von drei Hunden für eine Auswertung geeignet. Eine statistische Berechnung der Unterschiede ist damit nicht möglich, sodass eine deskriptive Beschreibung der gefundenen Unterschiede erfolgte.

In Abbildung 25 sind fünf zufällig ausgewählten Rohspektren von gesunden West Highland White Terriern dargestellt.

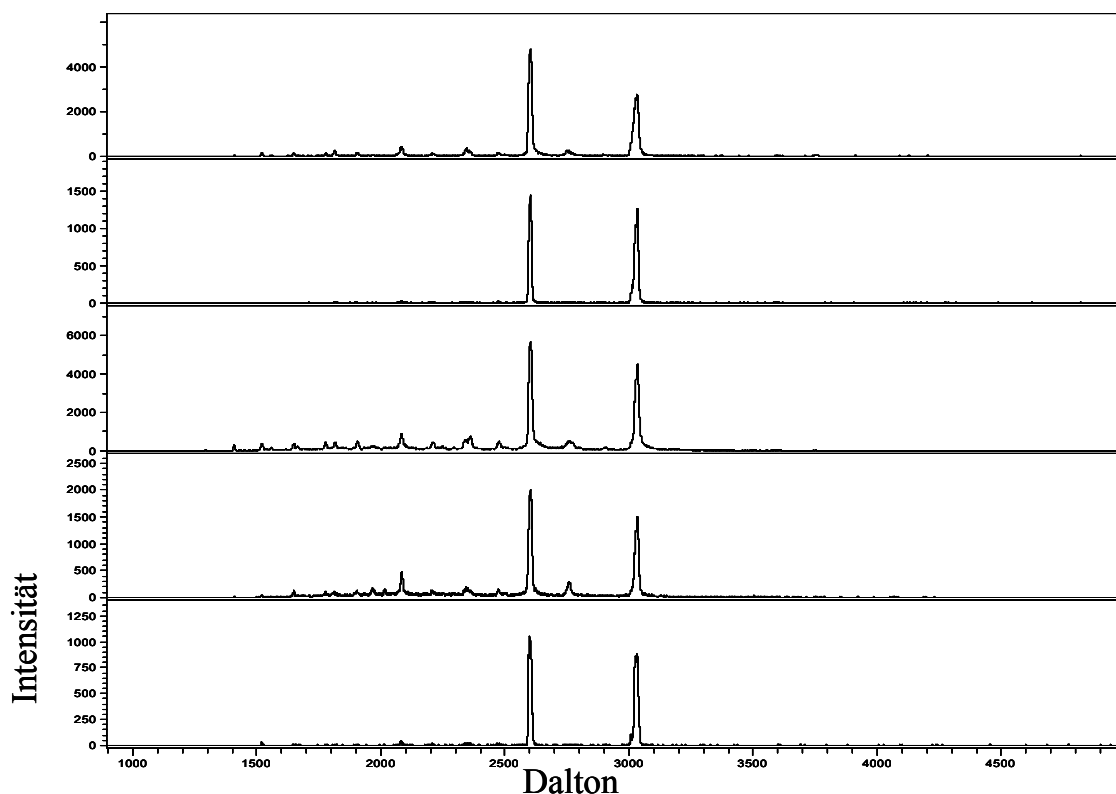


Abbildung 25: MALDI-TOF Rohspektren von 5 augengesunden West Highland White Terriern

Bei den gesunden WHWT zeigen sich die höchsten Intensitäten durchgehend bei 2599 und 3030 Dalton. Bei den Rohspektren der Proben von den an Keratokonjunktivitis sicca erkrankten Hunden findet sich dagegen durchgehend ein Peak bei 2246 Dalton, der bei gesunden Hunden nicht vorkommt. Die bei gesunden Hunden vorkommenden Peaks bei 2599 und 3030 Dalton, zeigen sich bei den erkrankten, unbehandelten Hunden stark verändert.

Während der Peak bei 2599 Dalton noch mit deutlich erniedrigter Intensität vorkommt, fehlt der bei 3030 Dalton völlig. In Abbildung 26 sind die Rohspektren der fünf Proben der an KCS erkrankten, unbehandelten WHWT dargestellt.

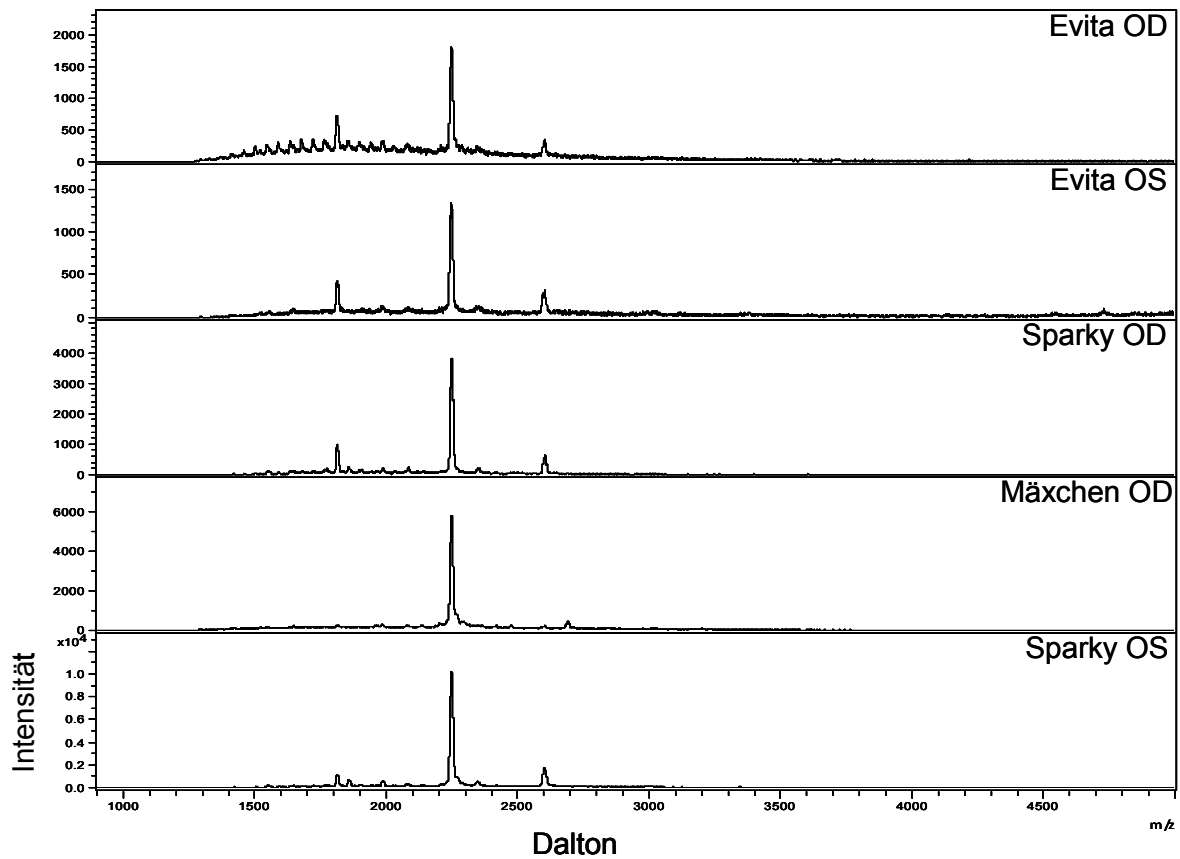


Abbildung 26: Vergleich der MALDI-TOF Rohspektren der an KCS erkrankten, unbehandelten West Highland White Terrier

5. Wie verändern sich die Tränenproteinspektren von an KCS erkrankten WHWT unter Behandlung mit Cyclosporin A-haltigen Augentropfen?

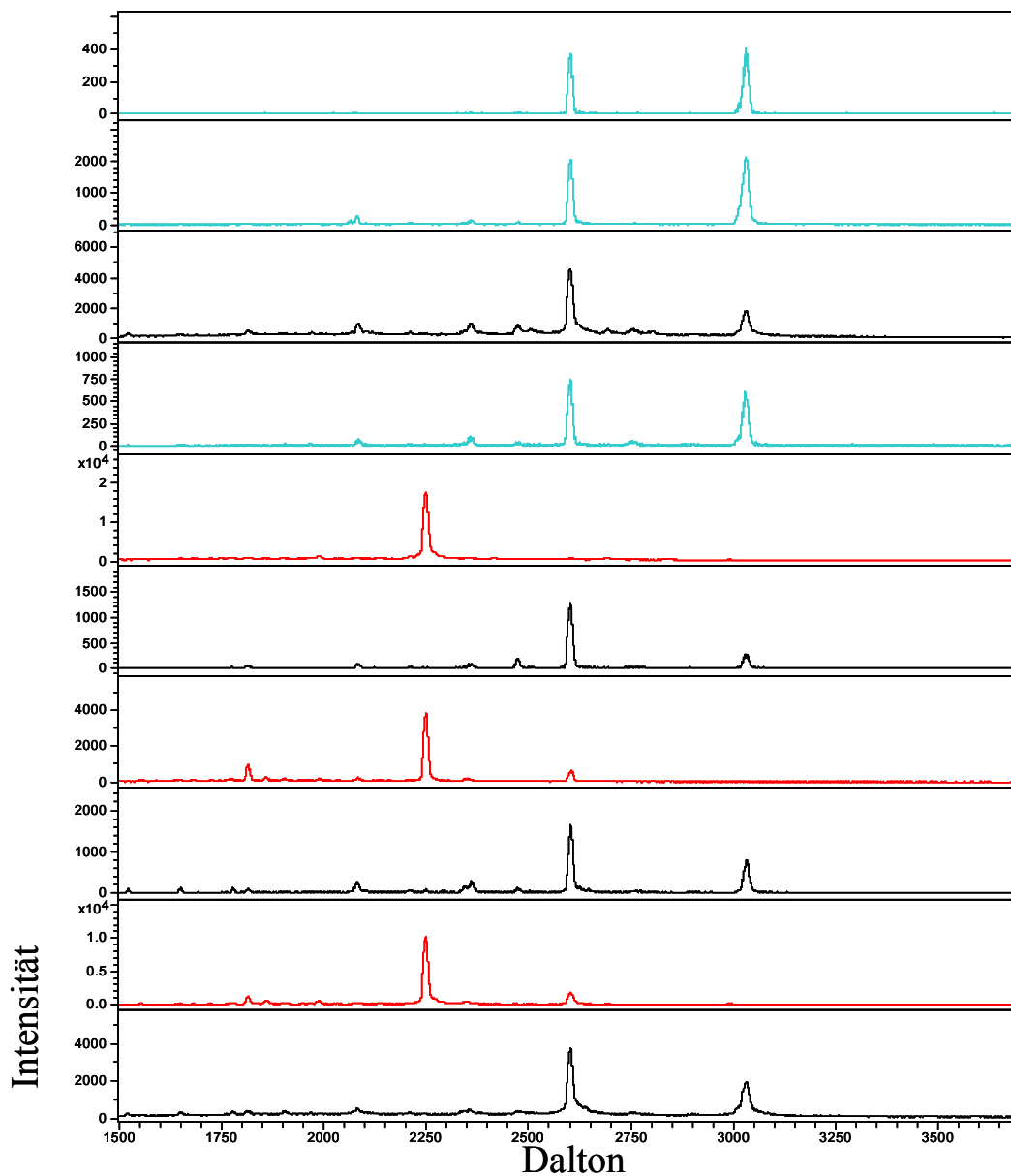


Abbildung 27: Vergleich der MALDI-TOF Rohspektren von gesunden West Highland White Terriern (schwarz) mit erkrankten (rot) und mit CsA behandelten (türkis) Hunden

Unter Behandlung mit Cyclosporin A-haltigen Augensalben zeigten die erkrankten Hunde wieder die gleiche Verteilung der Tränenproteine wie gesunde Hunde.

Die Hauptintensitäten zeigten sich wieder bei 2599 und 3030 Dalton. Ein Peak bei 2246 Dalton ließ sich nicht mehr nachweisen. In Abbildung 28 sind die an KCS erkrankten Hunde, die mit 0,2%iger Cyclosporin Salbe und in Abbildung 29 die an KCS erkrankten Hunde, die mit 2%igen Cyclosporin Tropfen und ein Hund, der mit Tacrolimus-Augentropfen behandelt wurde, dargestellt.

Auffällig war in den Rohspektren der mit 2%iger Cyclosporin-Augensalbe behandelten Hunde, dass sie sehr hohe Intensitäten des Proteins bei 2599 Dalton zeigten.

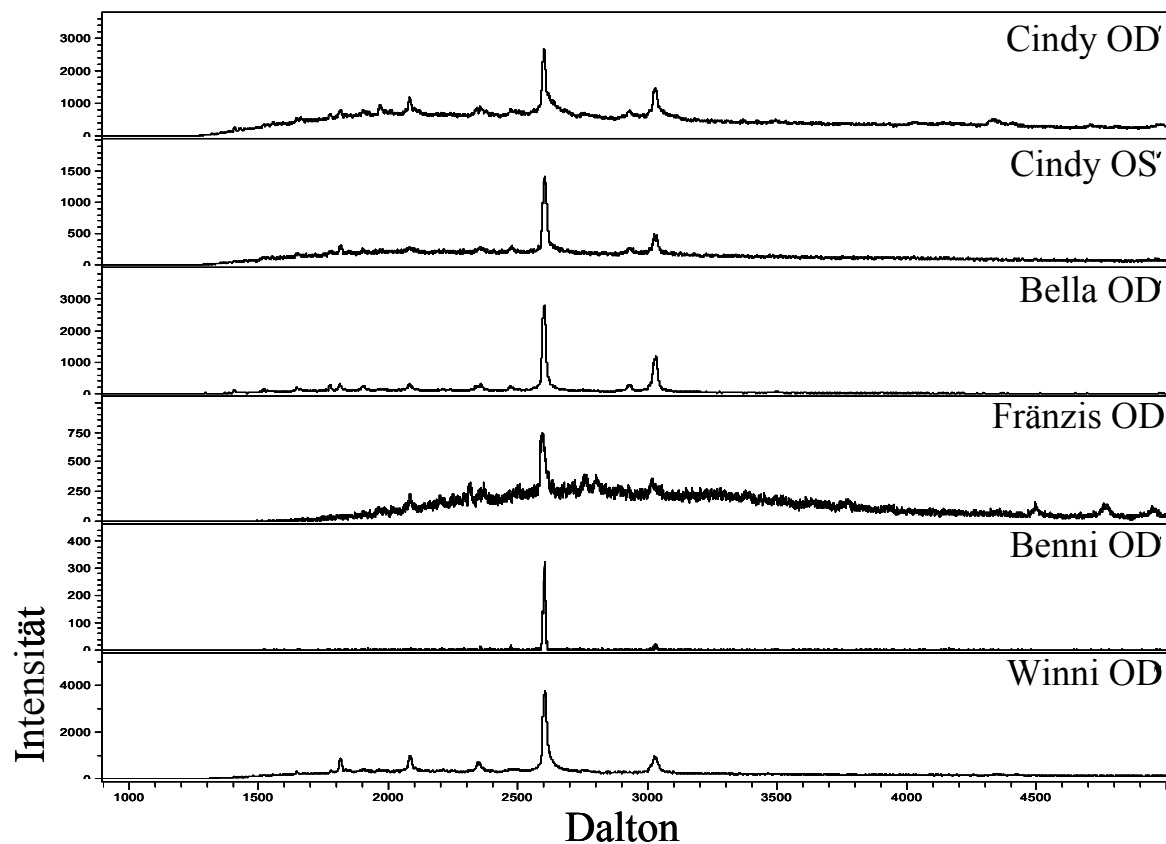


Abbildung 28: MALDI-TOF Rohspektren der mit 0,2%iger Cyclosporin Salbe behandelten KCS-West Highland White Terrier

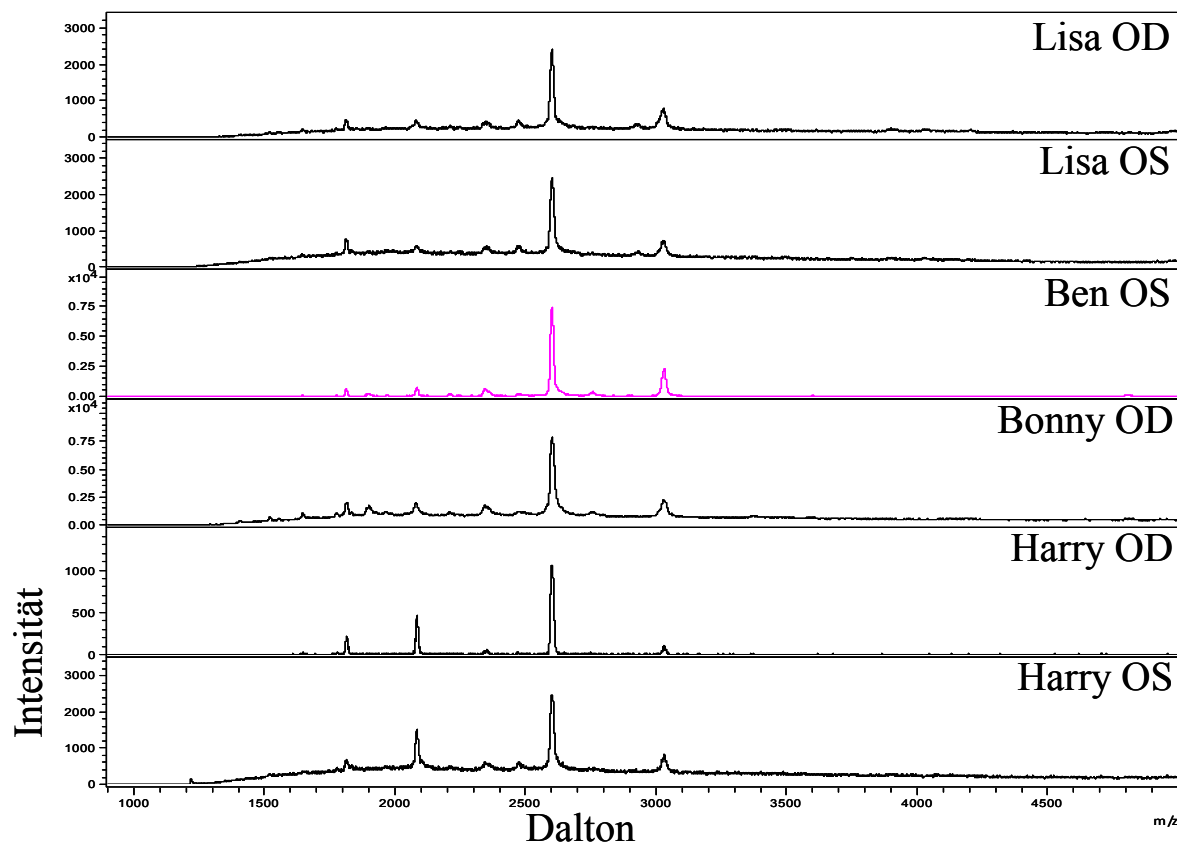


Abbildung 29: MALDI-TOF Rohspektren der mit 2%igen Cyclosporin Tropfen behandelten KCS-WHWT und die Probe des mit Tacrolimus behandelten KCS-WHWT (rosa)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hauptintensitäten der Tränenproteine bei gesunden Hunden im Meßbereich zwischen 1000 und 5000 Dalton bei einem Molekulargewicht von 2599 und 3030 Dalton liegen.

Bei den an KCS erkrankten Tieren kommt es zu einer deutlichen Veränderung des Spektrums. Die Veränderungen der Tränenproteine bei einer Erkrankung an KCS scheinen unter Cyclosporin A und Tacrolimus Behandlung reversibel. Leider war es nicht möglich Proben eines unbehandelten, an KCS erkrankten Hundes und nachfolgend Proben unter Behandlung zu bekommen, so dass diese Vermutung nicht belegt werden konnte.

Ein Einfluß von Alter und Geschlecht auf die Tränenproteine beim Hund konnte aufgrund der geringen Probenzahl nicht ermittelt werden. Ebenso konnten die unterschiedlichen Medikamentenwirkungen aufgrund geringer Probandenzahl nicht festgestellt werden.

5.4.3 Datenbanksuche

Um die gefundenen interessanten Peaks zu identifizieren wurden im MALDI-Reflektor Modus sog. LIFT Spektren erstellt. Aus den gewonnenen LIFT-Spektren kann die Sequenz der Peptide errechnet werden, um sie mit Datenbanken abzugleichen (SUCKAU et al., 2003).

Die Identifizierung von Peptiden und Proteinen erfolgt mit Hilfe der Mascot-Plattform (www.matrixscience.com) in Verbindung mit der Biotoools-Software. Mascot greift auf Onlinedatenbanken wie den hier verwendeten SwissProt und NCBI Datenbanken zu und gleicht die durch die LIFT-Spektren erhaltenen Sequenzinformationen mit den in den Datenbanken enthaltenen Proteinen ab. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt zusammen mit einem Wert („Scores“), der die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt, mit der es sich um das identifizierte Protein handelt. Bei der Suche wurde die Toleranz der Peaks auf 50ppm eingestellt.

Verschiedene Proteine konnten mit unterschiedlichen Einstellungen bei den Modifikationen in der Mascot-Plattform für das Protein bei 2599 Dalton gefunden werden:

Fibrinogen gamma chain, *Canis familiaris* (feste Modifikation: keine und variable Modifikation: Oxidation, Acetylierung, Ammonia-loss, Caroxymethylierung, Dehydrierung, Score: 20).

Metallothionein-4, *Canis familiaris* (feste Modifikation: Carbamyl (N-term) und variable Modifikation: Oxidation, Score: 10).

Translocation protein SEC63, *Canis familiaris* (feste Modifikation: keine und variable Modifikation: Oxidation, Phosphorylierung. Score: 7).

Metallothionein-2, *Canis familiaris* (feste Modifikation: keine und variable Modifikation: Amonia-loss, Dehydro, Ethanolyl, Oxidation. Score: 5).

Eine eindeutige Identifizierung gelang nicht. Die oben genannten Kandidaten erscheinen für eine weitere Untersuchung interessant.

6 DISKUSSION

Obwohl die Keratokonjunktivitis sicca bei Menschen und Tieren seit Jahren bekannt ist, bleiben die genaue Ätiologie und der Pathomechanismus der chronischen, ohne Behandlung fortschreitenden Erkrankung bis heute weitgehend ungeklärt.

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen über die Zusammensetzung der Proteine und Peptide in der Tränenflüssigkeit beim Hund. Auch die Veränderung in der Tränenflüssigkeit im Rahmen einer Keratokonjunktivitis sicca und die Veränderungen unter Behandlung sind bislang weitgehend ungeklärt.

Inhalt dieser Arbeit war es, neben einer allgemeinen Literaturübersicht zum Tränenfilm des Hundes das Vorkommen der Tränenproteine und Peptide in der Tränenflüssigkeit von gesunden Hunden im Bereich von 1000 bis 5000 Dalton darzustellen. Zusätzlich wurde eine kleine Studie über die Veränderung der Tränenproteine bei einer Erkrankung an Keratokonjunktivitis sicca und unter Behandlung mit Lakrimostimulans durchgeführt.

6.1 Diskussion der verwendeten Methoden:

6.1.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den gewonnenen Schirmer Eluaten wurde die von SMITH et al. (1985) entwickelte Methode verwendet. Bei der Bestimmung des Gesamtproteins in den Eluaten zeigten sich starke Varianzen. (Tabelle 20). Zudem war die gemessene Proteinmenge abhängig von der Wahl der Elutionslösung. Da die Messung des Proteingehaltes nicht in nativen Tränen stattfand, sondern in einer Lösung, ist ein Vergleich mit den in der Literatur (ROBERTS u. ERICKSON, 1962; BARRERA et al., 1992b; GINEL et al., 1993) angegebenen Daten nicht möglich.

6.1.2 Auswahl der Elutionslösung

Bei der Auswahl einer passenden Elutionslösung standen zwei Kriterien im Vordergrund: Zum einen sollte ein möglichst hoher Anteil des Proteins wieder aus den Schirmer-Streifen herausgelöst werden und zum anderen möglichst wenig Störsignale in der massenspektrometrischen Untersuchung verursacht werden. Um die am besten geeignete Elutionslösung zu finden wurden verschiedene Elutionslösungen getestet. Mit der Dodecylmaltosid-Lösung konnten zwar in der ersten Messung (Tabelle 19) mehr Proteine aus den Schirmer-Streifen herausgewaschen werden, aber die Störsignale, die eine Auswertung der Messungen

deutlich erschweren, waren ebenfalls stärker. Bei der Methanol-Lösung überwogen die Störsignale. Die folgenden Schirmer-Test-Streifen wurden deshalb mit einer 70%iger Ethanol-Lösung eluiert.

6.1.3 SELDI/MALDI

Um den Gehalt der verschiedenen Tränenproteine in der Tränenflüssigkeit darzustellen, wurde die Massenspektrometrie verwendet, die es ermöglicht sehr kleine Probenmengen zu untersuchen (HONG et al., 2005).

Erste Untersuchungen erfolgten mit dem SELDI-TOF (Ciphergen). Im SELDI-TOF Massenspektrometer erfolgt die Flugzeitanalyse ausschließlich im linearen Modus mit einem relativ kurzen Flugrohr (DE BOCK et al., 2010). Es kann dadurch keine Isotopenauflösung, aber eine gute Sensitivität erreicht werden. Es diente als initiale Stufe des Biomarker-Profilings in der Humanmedizin (GRUS et al., 2005). Dort fokussiert sich die Forschung mittlerweile nicht mehr auf die Haupttränenproteine, sondern auf die Peptide in einem kleineren Molekulargewichtsbereich, die sich noch frühzeitiger verändern als die großmolekularen Haupttränenproteine. Die weiteren Untersuchungen der Tränenproben erfolgten mit der MALDI Massenspektrometrie. Durch den Reflektormodus im MALDI-TOF-TOF ist es möglich Proteine und Peptide direkt zu identifizieren, wodurch die Erkennung von Biomarkern ermöglicht wird (LENNON, 1997; WEBER, 2006).

Die Sensitivität dieser Technologien erfordert eine sehr kontaminationsarme Behandlung des Probenmaterials. Die Schirmer-Streifen sollten zur Vermeidung von Verunreinigungen nur mit Handschuhen gehandhabt werden. Zudem sollten die gewonnenen Tränenproben kühl und unter Luftabschluß gelagert und transportiert werden, um Veränderungen der enthaltenen Proteine zu vermeiden (SITARAMAMMA et al., 1998).

Um systemische Fehler zu umgehen, ist es sinnvoll zahlreiche Proben gleichzeitig zu untersuchen, damit diese unter den gleichen Umweltbedingungen (Temperatur und Luftfeuchte) gemessen werden und entsprechend vergleichbar sind.

Zusätzliche Fehlerquellen finden sich in der Aufarbeitung der Proben und der Einstellung des MALDI- Gerätes selbst. Auch bei einwandfreiem Vorgehen lässt sich nicht garantieren, dass die erhaltenen MALDI- Messungen auswertbar sind. Dieses Problem erschwerte auch die in dieser Studie dargestellte Auswertung, da die angelegten Kriterien von zahlreichen Spektren nicht erfüllt wurden und diese somit nicht ausgewertet werden konnten.

Ein weiteres Problem stellte die Untersuchung der an KCS erkrankten Hunde dar. Sie besitzen nur noch sehr wenig wässrige Tränenflüssigkeit, dafür viel Muzin. Es lässt sich nur wenig Tränenflüssigkeit auffangen, der Muzinanteil ist dagegen erhöht. Der hohe Muzinanteil behindert den Fluss der wässrigen Tränenflüssigkeit und kann auch in der massenspektrometrischen Untersuchung zu Störsignalen führen.

Schwierig ist auch die Vergleichbarkeit verschiedener Schirmer-Streifen, da ein unterschiedliches Absorptionsverhalten der unterschiedlichen Materialien besteht (WILLIAMS, 2005a; HAWKINS u. MURPHY, 1986). Zudem ist der standardmäßig eingesetzte Schirmer-Test-Streifen mit einem Indikator versehen, welcher ebenso zu Störsignalen in der MALDI-Messung führen kann. Für diese Studie wurden daher indikatorfreie Schirmer-Test-Streifen verwendet.

6.1.4 Auswertung

In die statistische Auswertung wurden nur Spektren einbezogen, die ein hohes Signal-Rauschverhältnis, gut abgesetzte Peaks und eine Intensität von mindestens 800 bei den relevanten Peaks zeigten.

Um die Rohspektren vergleichbar zu machen, müssen sie vor der statistischen Auswertung mit komplexen Programmen (FlexAnalysis, Bruker u. PSP, Universität Mainz) bearbeitet werden. Auch diese Programme bergen die Gefahr einer deutlichen Beeinflussung des Ergebnisses. Proteine mit geringerer Intensität können zudem im Hintergrundrauschen unsichtbar werden.

Ein weiterer Probenverlust ergab sich bei der statistischen Auswertung. Da von einigen Tieren nicht die Proben beider Augen verwendet werden konnten, mussten Proben zufällig ausgewählt werden, um nicht einzelne Tiere oder die Probe von rechtem oder linkem Auge übermäßig zu bewerten. Eine Vorabauswahl eines Auges vor Probennahme erscheint nicht sinnvoll, da nicht vorausgesagt werden kann, ob alle Messungen nachher von ihrer Qualität her ausreichen, um sie auch auswerten zu können.

6.1.5 Datenbanksuche

Bei der Datenbanksuche über die Mascot-Plattform sind sehr viele Variablen einstellbar. Eine eindeutige Identifizierung eines Proteins war nicht möglich. Möglich ist auch, dass im Tränenfilm im Bereich von 1000 bis 5000 Dalton noch keine Proteine beim Hund eindeutig identifiziert wurden. Es fanden sich Kandidaten, die sich für eine weitere Untersuchung eignen würden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 SELDI

In den Vorversuchen mit dem SELDI Gerät konnten die Haupttränenproteine, Lysozym, Lactoferrin, Lipocalin, Immunglobulin A und Albumin, wie sie in der Humanmedizin beschrieben sind (VAN HAERINGEN, 1981; GACHON u. LACAZETTE, 1998; REDL, 2000; OHASHI et al., 2006) auch beim Hund dargestellt werden.

Einer der untersuchten Hunde zeigte keine klinischen Erscheinungen einer Augenerkrankung, das Ergebnis des Schirmer-Tränen-Testes fiel allerdings erniedrigt aus. Die gewonnenen Tränenproben dieses Hundes zeigten in der massenspektrometrischen Untersuchung schon deutliche Veränderungen. Die Haupttränenproteine waren nicht mehr alle nachweisbar und auch das noch vorhandene Lysozym kam nur in verminderter Intensität vor.

Da eine frühzeitige Stimulation der Tränendrüse durch Lakrimostimulans, wie Cyclosporin A besonders erfolgsversprechend in der Behandlung der Keratokonjunktivitis sicca ist, wäre eine Untersuchung prädisponierter Rassen unter Umständen ein hilfreiches diagnostisches Instrument, dem allerdings der hohe finanzielle Aufwand entgegen steht.

Ob es sich beim oben beschriebenen Befund um einen Einzelfall handelte, muss durch größere Probandenzahlen eruiert werden. Um eine solche Untersuchung als Vorsorgeuntersuchung empfehlen zu können, müsste auch das empfohlene Alter eingegrenzt werden. Auch dies lässt sich nur mit der Untersuchung einer größeren Probandenzahlen verwirklichen.

6.2.2 MALDI

Die weiteren Untersuchungen der Tränenproteine erfolgten mit dem MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer.

Im Molekulargewichtsbereich von 1000 bis 5000 Dalton zeigten sich bei gesunden Hunden die höchsten Intensitäten bei 2599 und 3030 Dalton. Diese Peaks waren bei allen gesunden Hunden nachweisbar. Im Vergleich mit den anderen Rassen zeigte der WHWT bei 2599 Dalton signifikant höhere Intensitäten als andere Hunderassen oder Mischlinge. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der WHWT von diesem Protein höhere Intensitäten benötigt als andere Hunderassen. Interessant wäre der Vergleich mit einer anderen prädisponierten Rasse. Aufgrund der inhomogenen Alters- und Geschlechtsverteilung war ein geparter Vergleich

zwischen den Rassen nicht möglich. Zusätzlich waren die Gruppen unterschiedlich groß, was die Signifikanz der Ergebnisse fraglich macht.

Der Vergleich der Verteilung der Tränenproteine zwischen den Geschlechtern ergab keine signifikanten Unterschiede, obwohl von Hund und Mensch bekannt ist, dass weibliche Individuen häufiger betroffen sind (SANSOM u. BARNETT, 1985). Problematisch in der Auswertung sind auch hier die unterschiedlichen Gruppengrößen zu bewerten.

Beim Vergleich zwischen den Altersgruppen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen berechnet werden. Dies entspricht nicht dem, was aus der Literatur bekannt ist (KASWAN et al., 1991; SULLIVAN et al., 2002; GRAHN u. STOREY, 2004). Von einer Keratokonjunktivitis sicca sind ältere Individuen häufiger betroffen, weshalb bei älteren Tieren schon erste Veränderungen erwartet wurden. Auch hier waren die Gruppengrößen unterschiedlich.

Da von den erkrankten Hunden zahlreiche Proben nicht auswertbar waren, lassen sich hier nur Tendenzen erkennen. Bei den erkrankten WHWT zeigten sich auffällige Veränderungen in den MALDI-Rohspektren. Diese Veränderungen waren bei allen erkrankten Hunden gleichartig. Ihnen fehlte der Peak bei 3030 Dalton und auch der Peak bei 2599 Dalton zeigte sich in deutlich verminderter Intensität. Zusätzlich fand sich bei ihnen ein Peak mit der höchsten Intensität bei 2246 Dalton. Ob es sich bei diesem Peak um ein anderes Protein, oder nur um ein Fragment der Haupttränenproteine handelt, konnte nicht geklärt werden.

Eine sehr interessante Fragestellung ist die Reversibilität der KCS unter Behandlung mit Lakrimostimulantien. Keiner der Hunde konnte zunächst unbehandelt und später behandelt untersucht werden. So lassen sich hier nur Vermutungen anhand der Proben von schon länger unter Behandlung befindlichen KCS-Patienten im Vergleich zu erkrankten, unbehandelten und gesunden Hunden anstellen. Alle mit Lakrimostimulans behandelten KCS-Patienten zeigten wieder das Tränenproteinprofil eines gesunden Hundes, mit den Hauptintensitäten bei 2599 und 3030 Dalton, während der Peak bei 2246 Dalton nicht mehr dargestellt werden konnte. Der Peak bei 3030 Dalton zeigte bei den behandelten Hunden sogar höhere Intensitäten, als bei den gesunden Hunden und dies besonders auffällig bei den mit 2%igen Cyclosporin-Tropfen behandelten. Die Hunde, die unter Behandlung mit 2%igem Cyclosporin A standen, zeigten auch beim Schirmer-Tränen-Test bessere Ergebnisse als die mit 0,2%igem Cyclosporin A behandelten. Es könnte also Erfolg versprechend sein, bei Hunden, die bislang

mit der herkömmlichen 0,2%igen CsA Augensalbe behandelt werden und das Ergebnis nur befriedigend ist, auf 2%ige CsA Augentropfen zu wechseln.

Unter Behandlung mit Tacrolimus war nur eine Probe auswertbar. Auch hier sollten Untersuchungen an größeren Probandengruppen stattfinden, da Tacrolimus eine kleinere Molekülgröße besitzt und so unter Umständen besser absorbiert wird. Leider ist das Medikament nur durch Import erhältlich. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine Regeneration der Tränenproteine unter Behandlung mit Lakrimostimulans. Ob eines der Medikamente besser wirkt, ist nicht zu beurteilen, da zuwenig Proben vorhanden waren und auch kein Vergleich beim einzelnen Tier zwischen unbehandelt und behandeltem Status möglich war. In der Human- oder Versuchstiermedizin wurden Untersuchungen in diesem Molekulargewichtsbereich unter ähnlichen Fragestellungen noch nicht gemacht, so dass ein Vergleich der gewonnenen Ergebnisse nicht möglich war.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Tränenfilmproteine beim Hund

Die KCS ist eine häufig auftretende Augenerkrankung bei Mensch und Hund.

Die Heilungsaussichten sind beim Hund umso besser, je früher eine Keratokonjunktivitis sicca erkannt wird. Eine gezielte Untersuchung auf den Gehalt der verschiedenen Tränenproteine oder deren Anteile, könnte schon frühzeitig pathologische Veränderungen aufdecken. Zudem ist die Träne als Probenmaterial leicht zugänglich und nichtinvasiv zu gewinnen. Aus diesem Grund wird in der Humanmedizin bereits versucht andere ophthalmologische und nicht-ophthalmologische Erkrankungen über Veränderungen der Tränenfilmproteine oder durch Antikörpernachweise in der Tränenflüssigkeit zu erkennen.

Um erstmals die Verteilung der Tränenproteine beim Hund im Bereich von 1000 bis 5000 Dalton darzustellen wurden mit Hilfe des Schirmer-Tränen-Tests von 165 Hunden Tränenproben genommen. Um rassespezifische Unterschiede zu detektieren, wurden verschiedenen Rassen miteinander verglichen. Besondere Beachtung fand dabei der West Highland White Terrier, der als prädisponierte Rasse für die Entwicklung einer KCS gilt (KASWAN u. SALISBURY, 1990; HERRERA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007). Es wurden Tränenproben von gesunden West Highland White Terriern, Staffordshire Terriern, Deutschen Schäferhunden, Labradoren, Mischlingen und anderen Rassen verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Rassen konnten bei 3030 Dalton nicht gefunden

werden. Bei 2599 Dalton zeigten sich allerdings signifikante Unterschiede in der Intensität zwischen WHWT und Mischlingen ($p= 0,02$), sowie zwischen WHWT und Hunden anderer Rassen ($p= 0,001$). Beim Vergleich der Geschlechter- oder Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass ältere weibliche Individuen häufiger von einer KCS betroffen sind (SANSOM u. BARNETT, 1985; KASWAN et al., 1991). Insgesamt fanden sich bei den gesunden Hunden die höchsten Intensitäten konstant bei 2599 und 3030 Dalton. Bei den an KCS erkrankten Tieren waren diese nicht mehr nachzuweisen, dafür zeigten sie die höchste Intensität bei 2246 Dalton. An KCS erkrankte WHWT unter Behandlung zeigten wie die gesunden Hunde die höchsten Intensitäten wieder bei 2599 und 3030 Dalton. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse somit für eine Regeneration der Tränenproteine unter Behandlung. Die gewonnenen MALDI-Messergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der klinischen Untersuchung von behandelten Hunden überein. Behandelte Hunde zeigen wieder eine glatte, glänzende Hornhaut und deutlich weniger mukösen Ausfluss. Die Patientenbesitzer von Hunden, welche Formulierungen mit 2% Cyclosporin erhielten sprachen von einem deutlichen Rückgang der klinischen Erscheinungen und einer deutlich gesteigerten Lebensqualität der Hunde. In der ophthalmologischen Untersuchung fand sich weniger Mukus und weniger deutliche Episkleralgefäße.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der Untersuchung von Tränenproteinen mit dem Massenspektrometer um eine sehr sensitive Technologie handelt, die leider mit umfangreichem Aufwand und hohe Kosten verbunden ist und bislang nur von wissenschaftlichem Interesse und nicht für die klinische Routinediagnostik geeignet ist.

Um die hier gezeigten Ergebnisse zu vertiefen wären weitere Untersuchungen an größeren Probandenzahlen und die Identifikation der auffallenden Proteine sinnvoll.

8 SUMMARY

Tearfilmproteins in dogs

KCS is a commonly occurring illness in both humans and dogs.

The sooner KCS is diagnosed, the higher the chances of healing. An examination of the content of tear proteins or their quantities would help to reveal pathological changes. Besides, tears are an easily accessible and non-invasive test material. In human medicine, therefore,

tears are used to detect other ophthalmological and non-ophthalmological illnesses through changes to the proteins of tears or through antibodies in tear liquid.

To show the distribution of proteins in tears of dogs in an area from 1000 to 5000 Dalton, 165 tear samples were taken with the help of the Schirmer tear test. In order to detect specific breed differences, several breeds were compared. An object of special attention was the West Highland White Terrier, which is a breed predisposed to develop KCS (KASWAN a. SALISBURY, 1990; HERRERA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007). Samples of tears were taken from healthy West Highland White Terriers (WHWT), Staffordshire Terriers, German Shepherds, Labradors, mongrels and other breeds. Significant differences between breeds at 3030 Dalton could not be detected. At 2599 Dalton significant differences in intensity between WHWT and mongrels ($p= 0,02$) as well as between WHWT and dogs of other breeds ($p= 0,001$) were found. Significant differences between gender groups and age groups were not found, even though it is known from previous publications that older female subjects are more often affected by KCS (SANSOM u. BARNETT, 1985; KASWAN et al., 1991). Overall, the highest intensities in healthy dogs were found at 2599 and 3030 Dalton. These were not found in affected dogs. Here, the highest intensity was at 2246 Dalton. WHWT samples that were affected by KCS and were then treated had a highest intensity as healthy dogs again at 2599 and 3030 Dalton. Overall, the results imply a regeneration of the tear proteins under treatment. The results from the MALDI are congruent to those of the clinical examination. Treated dogs have a smooth, shiny cornea and far less mucous discharge. The owners of the dogs that were given a two percent Cyclosporine medication reported a significant reduction in clinical symptoms of KCS and a marked improvement in quality of life. In the ophthalmological examination, less mucous and less episcleral vessels were found. In summary, it can be said that the examination of tear proteins with a mass spectrometer requires very sensitive technology, which unfortunately results in high costs. Until now, this examination is only of scientific interest and is not suitable for routine diagnostics.

In order to obtain further information regarding the results obtained, further examination of a larger quantity of probands and the identifications of the proteins would be helpful.

9. LITERATURVERZEICHNIS

ACHEAMPONG, A.A.; SHACKLETON, M.; TANG-LIU, D.; DING, S.; STERN, M.E.; DECKER, R. (1999): Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res.* **18**(2), 91-103.

AISEN, P.; LEIBMAN, A. (1972): Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochim Biophys Acta.* **257**(2), 314-323.

ANDERSSON, S.V.; EDMAN, M.C.; BEKMEZIAN, A.; HOLMBERG, J.; MIRCHEFF, A.K.; GIEROW, J.P. (2006): Characterization of beta-hexosaminidase secretion in rabbit lacrimal gland. *Exp Eye Res.* **83**(5), 1081-1088.

ARGÜESO, P.; GIPSON, I.K. (2001): Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res.* **73**(3), 281-289.

AGUIRRE, G.D.; RUBIN, L.F.; HARVEY, C.E. (1971): Keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **158**(9), 1566-1579.

AZZAROLO, A.M.; WOOD, R.L.; MIRCHEFF, A.K.; RICHTERS, A.; OLSEN, E.; BERKOWITZ, M.; BACHMANN, M.; HUANG, Z.M.; ZOLFAGARI, R.; WARREN, D.W. (1999): Androgen influence on lacrimal gland apoptosis, necrosis, and lymphocytic infiltration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**(3), 592-602.

BARKA, T.; ASBELL, P.A.; VAN DER NOEN, H.; PRASAD, A. (1991): Cystatins in human tear fluid. *Curr Eye Res.* **10**(1), 25-34.

BARNETT, K.C. (1980): Diseases of the nictitating membrane of the dog. *J Small Anim Pract.* **19**(2), 101-108.

BARNETT, K.C. (2006): Congenital keratoconjunctivitis sicca and ichthyosiform dermatosis in the cavalier King Charles spaniel. *J Small Anim Pract.* **47**(9), 524-528.

BARRERA, R.; CINTA MANE, M.; RODRIGUEZ, J.F.; JIMENEZ, A. (1992a): Keratoconjunctivitis sicca and diabetes mellitus in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* **200**(12), 1967-1968.

BARRERA, R.; JIMENEZ, A.; LOPEZ, R.; MANE, M.C.; RODRIGUEZ, J.F.; MOLLEDA, J.M. (1992b): Evaluation of total protein content in tears of dogs by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *Am J Vet Res.* **53**(4), 454-456.

Optima Pharmazeutische GmbH (2012)
Produktinformation Tears Again
Abgerufen am: 30.05.2012 um 08:12

BEHNDIG, A.; SVENSSON, B.; MARKLUND, S.L.; KARLSSON, K. (1998): Superoxide dismutase isoenzyme in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **39**(3), 471-475.

BENZ, P.; TICHY, A.; NELL, B. (2008): Review of the measuring precision of the new Meibometer MB550 through repeated measurements in dogs. *Vet Ophthalmol.* **11**(6), 368-74.

- BERDOULAY, A.; ENGLISH, R.V.; NADELSTEIN, B. (2005):
Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca.
Vet Ophthalmol. **8**(4), 225-232.
- BERGER, S.L.; KING, V.L. (1998):
The fluctuation of tear production in the dog.
J Am Anim Hosp Assoc. **34**(1), 79-83.
- BERRY, M.; ELLINGHAM, R.B.; CORFIELD, A.P. (2000):
Membrane-associated mucins in normal human conjunctiva.
Inves Ophthalmol Vis Sci. **41**(2), 398-403.
- BOLZAN, A.A.; BRUNELLI, A.T.; CASTRO, M.B.; SOUZA, M.A.; SOUZA, J.L.; LAUS, J.L. (2005):
Conjunctival impression cytology in dogs.
Vet Ophthalmol. **8**(6), 401-405.
- BOTELHO, S.Y.; HISADA, M.; FUENMAYOR, N. (1966):
Functional innervation of the lacrimal gland of the cat.
Arch Ophthalmol. **76**(4), 581-588.
- BOUNOUS, D.I.; CARMICHAEL, K.P.; KASWAN, R.L.; HIRSH, S.; STILES, J. (1995):
Effects of ophthalmic cyclosporine on lacrimal gland pathology and function in dogs with keratoconjunctivitis sicca.
Vet Comp Ophthalmol. **5**(1), 5-12.
- BREWITT, H.; ZIERHUT, M. (2001):
Trockenes Auge.
Heidelberg: Kaden. ISBN 3-922777-50-3.
- BRISSETTE-STORKUS, C.S.; REYNOLDS, S.M.; LEPISTO, A.J.; HENDRICKS, R.L. (2002):
Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **43**(7), 2264-2271.
- BRITO, F.L.C.; SILVA, V.A.; MAIA, F.C.L.; PEREIRA, J.R.; LAUS, J.L. (2007):
Microalterations in the third eyelid gland of dogs with keratoconjunctivitis sicca secondary to distemper.
Arq Bras Med Vet Zootec. **59**(2), 340-344.
- BRON, A.J. (1994):
Non-Sjögren dry eye: pathogenesis, diagnosis and animal models.
Adv Exp Med Biol. **350**(2), 471-488.
- BRON, A.J.; TIFFANY, J.M.; GOUVEIA, S.M.; YOKOI, N.; VOON, L.W. (2004):
Functional aspects of the tear film lipid layer.
Exp Eye Res. **78**(3), 347-360.
- BROOKS, D.E. (1991):
Canine conjunctiva and nictitating membrane.
In: *Veterinary Ophthalmology*.
Philadelphia (u.a.): Lippincott. ISBN 978-0-7817-6657-9. 290-306.
- BROWN, M.; GALLAND, J.C.; DAVIDSON, H.J.; BRIGHTMAN, A.H. (1996):
The phenol red thread tear test in the dog.
Vet Comp Ophthalmol. **6**(4), 274-278.
- BURKSCHAT, M.; CRAMER, E.; KAMPS, U. (2004):
Beschreibende Statistik.
Berlin (u.a.): Springer. ISBN: 3-540-03239-8.

- BURON, N.; GUERY, L.; CREUZOT-GARCHER, C.; LAFONTAINE, P.P.; BRON, A.; RIO, M.C.; SOLARY, E. (2008):
Trefoil factor TFF1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **49**(9), 3790-3798.
- BUTOVICH, I.A.; MILLAR, T.J.; HAM, B.M. (2008):
Understanding and analyzing meibomian lipids- a review.
Curr Eye Res. **33**(5), 405-420.
- CABRAL, V.P.; LAUS, J.L.; DAGLI, M.L.Z.; PEREIRA, G.T.; TALIERI, I.C.; MONTEIRO, E.D; MAMEDE, F.V. (2005):
Canine lacrimal and third eyelid superficial glands` macroscopic and morphometric characteristics.
Cienc Rural., Santa Maria **35**(2), 391-397.
- CARLSTEDT, I.; HERRMANN, A.; HOVENBERG, H.; LINDELL, G.; NORDMAN, H.; WICKSTRÖM, C.; DAVIS, J.R. (1995):
“Soluble” and “insoluble” mucins-identification of distinct populations.
Biochem Soc Trans. **23**(4), 845-851.
- CARRAWAY, K.L.; PRICE-SCHIAVI, S.A.; KOMATSU, M.; IDRIS, N.; PEREZ, A.; LI, P.; JEPSON, S., ZHU, X.; CARVAJAL, M.E.; CARRAWAY, C.A. (2000):
Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues.
Front Biosci. **1**(5), 95-107.
- CARRINGTON, S.D.; BEDFORD, P.G.C.; GUILLON, J.P.; WOODWARD, E.G. (1987):
Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film. 2. Keratokonjunctivitis sicca in the dog.
J Small Anim Pract., **28**(8), 671-679.
- CARRINGTON, S.D.; GOODALL, C.; MYERSCOUGH, N.; CORFIELD, A.P. (1993):
Canine ocular mucins in health and dry eye disease.
Biochem Soc Trans. **21**(4), 484.
- CARTER, R.T.; KAMBAMPATI, R.; MURPHY, C.J.; BENTLEY, E. (2007):
Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in experimentally wounded canine corneas and spontaneous chronic corneal epithelial defects.
Cornea **26**(10), 1213-1219.
- CARTER, R.; COLITZ, C.M.H. (2002):
The causes, diagnosis, and treatment of canine keratoconjunctivitis sicca.
Vet Med. **97**, 683-694.
- CARVALHO, A.R.R.; NARANJO, C.; LEIVA, M.; FONDEVILA, D.; IBORRA, A.; MARTINEZ, P.; PENA, T. (2009):
Canine normal corneal epithelium bears a large population of CD45-positive cell.
Vet J. **179**(3), 437-442.
- CHANDLER, J.W.; GILLETTE, T.E. (1983):
Immunologic defense mechanisms of the ocular surface.
Ophthalmology **90**(6), 585-591.
- CHANG, J.H.; McCLUSKEY, P.J.; WAKEFIELD, D. (2006):
Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease.
Br J Ophthalmol. **90**(1), 103-108.
- CHAO, C.C.; BUTALA, S.M.; HERP, A. (1988):
Studies on the isolation and composition of human ocular mucin.
Exp Eye Res. **47**(2), 185-196.

- CHEN, W.L.; LIU, S.; LI, H.G.; WANG, Y.Y.; WANG, K. (2008):
Transplantation of a reverse facial artery pedicled submandibular gland in a dog.
Int J Oral Maxillofac Surg. **37**(11), 1054-1058.
- CHEW, C.K.S.; HYKIIN, P.G.; JANSEWEIJER, C.; DIKSTEIN, S.C.; TIFFANY, J.M.; BRON, A.J. (1993):
The casual level of meibomian lipids in humans.
Curr Eye Res. **12**(3), 255-259.
- COASSIN, M.; LAMBIASE, A.; COSTA, N.; De GREGORIO, A.; SGRULLETTA, R.; SACCHETTI, M.;
ALOE, L.; BONINI, S. (2005):
Efficacy of topical nerve growth factor treatment in dogs affected by dry eye.
Arch Clin Exp Ophthalmol. **243**(2), 151-155.
- COLLINS, B.K.; MOORE, C.P.; HAGEE, J.H. (1986):
Sulfonamide-associated keratoconjunctivitis sicca and corneal ulceration in a dysuric dog.
J Am Vet Med Assoc. **189**(8), 924-926.
- CORFIELD, A.P.; CARRINGTON, S.D.; HICKS, S.J.; BERRY, M.; ELLINGHAM, R. (1997):
Ocular mucins: purification, metabolism and functions.
Prog Ret Eye Res. **16**(4), 627-656.
- CORFIELD, A.P.; DONAPATY, S.R.; CARRINGTON, S.D.; HICKS, S.J.; SCHAUER, R.; KOHLA, G.
(2005):
Identification of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid in normal canine pre-ocular tear film secreted mucin and
its depletion in Keratokonjunctivitis sicca.
Glycoconj J. **22**(7-9), 409-416.
- CORNELL-BELL, A.H.; SULLIVAN, D.A.; ALLANSMITH, M.R. (1985):
Gender-related differences in the morphology of the lacrimal gland.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **26**(8), 1170-1175.
- CORRALES, R.M.; STERN, M.E.; DE PIAVA, C.S.; WELCH, J.; DE-QUAN, L.; PFLUGFELDER, S.C.
(2006):
Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **47**(8), 3293-3302.
- CREUZOT, C.; PASSEMARD, M.; VIAU, S.; JOFFRE, C.; POULIQUEN, P.; ELENA, P.P.; BRON, A.;
BRIGNOLE, F. (2006):
Improvement of dry eye symptoms with polyunsaturated fatty acids.
J Fr Ophthalmol. **29**(8), 868-873.
- CRIPPS, M.M.; PATCHEN-MOOR, K. (1988):
Modulation of lacrimal protein secretion by an enkephalin analogue.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **29**, 57.
- CULLEN, C.L.; IHLE, S.L.; WEBB, A.A.; McCARVILLE, C. (2005):
Keratoconjunctival effects of diabetes mellitus in dogs.
Vet Ophthalmol. **8**(4), 215-224.
- DANA, M. R. (2004):
Corneal antigen-presenting cells: diversity, plasticity and disguise: the Cogan lecture.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **45**(3), 722-727.
- DARTT, D.A. (1989):
Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review.
Curr Eye Res. **6**(6), 619-636.
- DARTT, D.A. (2004):
Control of mucin production by ocular surface epithel cells.
Exp Eye Res. **78**(2), 173-185.

DARTT, D.A.; McCARTHY, D.M.; MERCER, H.J.; KESSLER, T.L.; CHUNG, E.H.; ZIESKE, J.D. (1995):
Localization of nerves adjacent to goblet cells in rat conjunctiva.
Curr Eye Res. **14**(11), 993-1000.

DA SILVA, E.G.; GALERA, P.D. (2004):
Evaluation of the tear formation during the neonatal period in small breed dogs, using the trimmed Schirmer tear test: STT 1& STT 2.
Vet Ophthalmol. **7**(6), 438.

DAVIDSON, H.J.; GERLACH, J.A.; BULL, R.W. (1992):
Determination of protein concentrations and their molecular weight in tears from cats with normal corneas and cats with corneal sequestrum.
Am J Vet Res. **53**(10), 1756-1759.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. (2004):
The tear film and ocular mucins.
Vet Ophthalmol. **7**(2), 71-77.

DAY, M.J. (1996):
Low IgA concentration in the tears of German sheperd dogs.
Aust Vet J. **74**(6), 433-434.

DE BOCK, M.; DE SENY, D.; MEUWIS, M.; CHAPELLE, J.; LOUIS, E.; MALAISE, M.; MERVILLE, M.; FILLET, M. (2010):
Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS.
J Biomed Biotechnol. Epub.

DEPLEWSKI, D.; ROSENFELD, R.L. (2000):
Role of hormones in pilosebaceous unit development.
Endocr Rev. **21**(4), 363-392.

DE SOUZA, G.A.; GODOY, L.M.F.; MANN, M. (2006):
Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors.
Genome Biol. **7**(8), R72.

DEWS (2007):
Dry Eye Workshop.
Ocul Surf **5**(2), 93-204.

DIEBOLD, Y.; RIOS, J.D.; HODGES, R.R.; RAWE, I.; DARTT, D.A. (2001):
Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **42**(10), 2270-2282.

EHINGER, B. (1966):
Ocular and orbital vegetative nerves.
Acta Physiol Scand. **268**, 1-35.

ELLWEIN, L.B.; URATO, C.J. (2002):
Use of eye care and associated charges among the Medicare population: 1991-1998.
Arch Ophthalmol. **120**(6), 804-811.

FARRIS, R.L. (1985):
Tear analysis in contact lens wearers.
Trans Am Ophthalmol Soc. **83**, 501-545.

FEENSTRA, R.P.; TSENG, S.C. (1992):
Comparison of fluorescein and rose bengal staining.
Ophthalmology **99**(4), 605-617.

- FERRERA, D.; MONTEFORTE, R.; BACCARI, G.C.; MINUCCI, S.; CHIEFFI, G. (2004):
Androgen and estrogen receptors expression in the rat exorbital lacrimal gland in relation to "harderianization".
J Exp Zool A Comp Exp Biol. **301**(4), 297-306.
- FLANAGAN, J.L.; WILLCOX, M.D. (2009):
Role of lactoferrin in the tear film.
Biochimie **91**(1), 35-43.
- FLEMING, A. (1922):
On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.
Roy Soc Proc B. **93**, 306-317.
- FLUCKINGER, M.; HAAS, H.; MERSCHAK, P.; GLASGOW, B.; REDL, B. (2004):
Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores.
Antimicrob Agents Chemother. **48**(9), 3367-3372.
- FUKUDA, M.; FULLARD, R.J.; WILLCOX, M.D.P.; BALERIOLA-LUKAS, C.; BESTAWROS, F.; SWEENEY, D.; HOLDEN, B.A. (1996):
Fibronectin in the tear film.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **37**(2), 459-467.
- FULLARD, R.J.; SNYDER, C. (1990):
Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **31**(6), 1119-1126.
- FURUE, M.; GASPARI, A.A.; KATZ, S.I. (1988):
Cyclosporin A inhibits proliferation of normal and transformed keratinocytes.
J Invest Dermatol. **90**(6), 796-800.
- GACHON, A.M.F.; LACAZETTE, E. (1998):
Tear lipocalin and the eye's front line of defence.
Br J Ophthalmol. **82**(4), 453-455.
- GASYMOV, O.K.; ABDURAGIMOV, A.R.; YUSIFOV, T.N.; GLASGOW, B.J. (1999):
Interaction of tear lipocalin with lysozyme and lactoferrin.
Biochem Biophys Res Commun. **265**(2), 322-325.
- GAO, J.; SCHWALB, T.A.; ADDEO, J.V.; GHOSN, C.R.; STERN, M.E. (1998):
The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy.
Cornea **17**(6), 654-663.
- GEERLING, G.; HARTWIG, D. (2002):
Autologe Serum-Augentropfen zur Therapie der Augenoberfläche.
Ophthalmologie **99**(12), 946-959.
- GELATT, K.N. (1970):
Treatment of canine keratoconjunctivitis sicca by parotid duct transposition.
J Am Anim Hosp Assoc. **6**, 1-22.
- GELATT, K.N. (2007):
Veterinary Ophthalmology.
Philadelphia (u.a.): Lippincott. ISBN 978-0-7817-6657-9.
- GELATT, K.N.; MACKAY, O.; WIDENHOUSE, C.; WIDENHOUSE, T.S.; STOPEK, J.B. (2006):
Effect of lacrimal punctal occlusion on tear production and tear fluorescein dilution in normal dogs.
Vet Ophthalmol. **9**(1), 23-27.

- GELATT, K.N.; PEIFFER, R.L.; ERICKSON, J.L.; GUM, G.G. (1975):
Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test.
J Am Vet Med Assoc. **166**(4), 368-370.
- GENDLER, S.J.; SPICER, A.P. (1995):
Epithelial mucin genes.
Annu Rev Physiol. **57**, 607-634.
- GILBARD, J.P.; ROSSI, S.R.; GRAY, K.L.; HANNINEN, L.A.; KENYON, K.R. (1988):
Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **29**(3), 374-378.
- GILGER, B.C. (2008):
Immunology of the ocular surface.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. **38**(2), 223-231.
- GINEL, P.J.; NOVALES, M.; GARCIA, M.; MARTIN, E.M.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J.M. (1993):
Immunglobulins in stimulated tears of dogs.
Am J Vet Res. **54**(7), 1060-1063.
- GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P.; PHILLIPS, T.E. (2002):
Morphological evidence of M cells in healthy canine conjunctiva-associated lymphoid tissue.
Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. **240**(3), 220-226.
- GIPSON, I.K. (2003):
Distribution of mucins at the ocular surface.
Exp Eye Res. **78**(3), 379-388.
- GIPSON, I.K.; INATOMI, T. (1997):
Mucin genes expresses by the ocular surface epithelium.
Prog Ret Eye Res. **16**(1), 81-98.
- GIPSON, I.K.; INATOMI, T. (1998):
Cellular origin of mucins of the ocular surface.
Adv ExpMed Biol. **438**, 221-227.
- GLASGOW, B.J.; ABDURAGIMOV, A.R.; GASIMOV, O.K.; YUSIFOV, T.N. (2002):
Tear lipocalin: structure, function and molecular mechanisms of action.
Adv Exp Med Biol. **506**, 555-565.
- GLASGOW, B.J.; MARSHALL, G.; GASIMOV, O.K. (1999):
Tear lipocalins: potential lipid scavengers for the corneal surface.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **40**(13), 3100-3107.
- GOUVEIA, S.M.; TIFFANY, J.M. (2005):
Human tear viscosity: an interactive role for proteins and lipids.
Biochim Biophys Acta. **1753**(2), 155-163.
- GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. (2004):
Lacrimostimulants and lacrimomimetics.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. **34**(3), 739-753.
- GREINER, J.V.; GLONEK, T.; KORB, D.R.; HEARN, S.L.; WHALEN, A.C.; ESWAY, J.E.; LEAHY, C.D. (1998):
Effect of meibomian gland occlusion on tear film lipid layer thickness.
Adv Exp Med Biol. **438**, 345-348.

- GRUS, F.H.; PODUST, V.N.; BRUNS, K.; LACKNER, K.; FU, S.; DALMASSO, E.A.; WIRTHLIN, A.; PFEIFFER, N. (2005):
SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **46**(3), 863-876.
- GRUS, F.H.; AUGUSTIN, A.J.; PFEIFFER, N.; SCHMIDT-ERFURTH, U. (2001):
Vom Genom zum Proteom.
Ophthalmologe **98**(12), 1132-1137.
- GUMUS, K.; CAVANAGH, D.H. (2009):
The role of inflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca.
Clin Ophthalmol. **3**, 57-67.
- HAMANO, H.; MITSUNAGA, S. (1973):
Viscosity of rabbit tears.
Japan J Ophthalmol. **17**, 290-299.
- HAMAWY, M.M. (2003):
Molecular actions of calcineurin inhibitors.
Drug News Perspect. **16**(5), 277-282.
- HAMOR, R.E.; ROBERTS, S.M.; SEVERIN, G.A.; CHAVKIN, M.J. (2000):
Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds.
Am J Vet Res. **61**(11), 1422-1425.
- HAMRAH, P.; HUQ, S.O.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; DANA, M.R. (2003):
Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells.
J Leukoc Biol. **74**(2), 172-178.
- HARKER, D.B. (1970):
A modified Schirmer tear test technique.
Vet Rec. **86**, 196-199.
- HARTLEY, C.; WILLIAMS, D.L.; ADAMS, V.J. (2006):
Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs.
Vet Ophthalmol. **9**(1), 53-57.
- HAWKINS, E.C.; MURPHY, C.J. (1986):
Inconsistencies in the absorptive capacities of Schirmer tear test strips.
J Am Vet Med Assoc. **188**(5), 511-513.
- HELPER L.C. (1970):
The effect of lacrimal gland removal on the conjunctiva and cornea of the dog.
J Am Vet Med Assoc. **157**(1), 72-75.
- HELPER L.C. (1996):
The tear film in the dog. Cause and treatment of diseases associated with overproduction and underproduction of tears.
Anim Eye Res. **15**(1-2), 5-11.
- HENDRICKS, R.L.; JANOWICZ, M.; TUMPEY, T.M. (1992):
Critical role of corneal Langerhans cells in CD4- but not CD8-mediated immunopathology in herpes simplex virus-1- infected mouse corneas.
J Immunol. **148**(8), 2522-2529.
- HERRERA, H.D.; WEICHSLEDER, N.; GOMEZ, J.R.; De JALON, J.A. (2007):
Severe, unilateral, unresponsive keratoconjunctivitis sicca in 16 juvenile Yorkshire Terriers.
Vet Ophthalmol. **10**(5), 285-288.

- HICKS, S. J.; CARRINGTON, S. D.; KASWAN, R.L.; STERN, M.E.; CORFIELD, A.P. (1995):
Secreted and membrane bound ocular mucins from normal and dry eye dogs.
Biochem Soc Trans. **23**(4), 537.
- HICKS, S.J.; CARRINGTON, S.D.; KASWAN, R.L.; ADAM, S.; BARA, J.; CORFIELD, A.P. (1997):
Demonstration of discrete secreted and membrane-bound ocular mucins in the dog.
Exp Eye Res. **64**(6), 597-607.
- HICKS, S.J.; CORFIELD, A.P.; KASWAN, R.L.; HIRSH, S.; STERN, M.E.; BARA, J.; CARRINGTON, S.D.
(1998):
Biochemical analysis of ocular surface mucin abnormalities in dry eye: the canine model.
Exp Eye Res. **67**(6), 709-718.
- HIRSH, S.G.; KASWAN, R.L. (1995):
A comparative study of Schirmer tear test strips in dogs.
Vet Comp Ophthalmol. **5**, 215-217.
- HOLLINGSWORTH, S.R.; CANTON, D.D.; BUYUKMIHCI, N.C.; FARVER, T.B. (1992):
Effect of topically administered atropine on tear production in dogs.
J Am Vet Med Assoc. **200**(10), 1481-1484.
- HOLZFEIND, P.; MERSCHAK, P.; DIEPLINGE, H.; REDL, B. (1995):
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. **61**(4), 495-500.
- HOLLY, F.J. (1973):
Formation and rupture of the tear film.
Exp Eye Res. **15**(5), 515-525.
- HOLLY, F.J.; HOLLY, T.F. (1994):
Advances in ocular tribology.
Adv Exp Med Biol. **350**, 275-284.
- HONG, H.; DRAGAN, Y.; EPSTEIN, J.; TEITEL, C.; CHEN, B.; XIE, Q.; FANG, H.; SHI, L.; PERKINS, R.;
TONG, W. (2005):
Quality control and quality assessment of data from surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) time-of flight (TOF) mass spectrometry (MS).
BMC Bioinformatics. **6**, Suppl. 2, 5
- HUANG, A.J.; BELLDEGRUN, R.; HANNINEN, L.; KENYON, K.R.; TSENG, S.C.; REFOJO, M.F. (1989):
Effects of hypertonic solutions on conjunctival epithelium and mucin like glycoproteins.
Cornea **8**(1), 15-20.
- HUTCHENS, T.; YIP, T. (1993):
New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules.
Rapid Commun Mass Spectrom. **7**, 576-580.
- HYKIN, P.G.; BRON, A.J. (1992):
Age-related morphological changes in lid margin and meibomian gland anatomy.
Cornea **11**(4), 334-342.
- IMANISHI, J.; KAMIYAMA, K.; IGUCHI, I.; KITA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. (2000):
Growth Factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea.
Prog Retin Eye Res. **19**(1), 113-129.
- ISREB, M.A.; GREINER, J.V.; KORB, D.R.; GLONEK, T.; MODY, S.S.; FINNEMORE, V.M.; REDDY, C.V.
(2003):
Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break up time and Schirmer's test.
Eye **17**(1), 79-83.

- JAMIESON, P.M.; SCUDAMORE, C.L.; RUPPERT, C.E.; MAUCLINE, S.; SIMPSON, J.W. (2002):
Canine dysautonomia: two clinical cases.
J Small Anim Pract. **43**(1), 22-26.
- JAUHIAINEN, M.; SETÄLÄ, N.L.; EHNHOLM, C.; METSO, J.; TERVO, T.M.; ERIKSSON, O.;
HOLOPAINEN, J.M. (2005):
Phospholipid transfer protein is present in human tear fluid.
Biochemistry **44**(22), 8111-8116.
- JESTER, J.V.; NICOLAIDES, N.; SMITH, R.E. (1981):
Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **20**(4), 537-547.
- JUMBLATT, M.M.; IMBERT, Y.; YOUNG, W.W.; FOULKS, G.N.; STEELE, P.S.; DEMUTH, D.R. (2006):
Glycoprotein 340 in normal human ocular surface tissues and tear film.
Infect Immun. **74**(7), 4058-4063.
- JUMBLATT, M.M.; GEOGHEGAN, T.E.; JUMBLATT, J.E. (1995):
Mucin gene expression in human conjunctiva.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **36**(8), 997.
- JUMBLATT, M.M.; MC KENZIE, R.W.; STEELE, P.S.; EMBERTS, C.G.; JUMBLATT, J.E. (2003):
MUC7 expression in the human gland and conjunctiva.
Cornea **22**(1), 41-45.
- KAFARNIK, C; FRITSCHKE, J.; REESE, S. (2008):
Corneal innervation in mesocephalic and brachycephalic dogs and cats: assessment using in vivo confocal
microscopy.
Vet Ophthalmol. **11**(6), 363-367.
- KAFARNIK, C; FRITSCHKE, J.; REESE, S. (2007):
In vivo confocal microscopy in the normal cornea of cats, dogs and birds.
Vet Ophthalmol. **10**(4), 222-230.
- KAHAN, I.L.; OTTOVAY, E. (1975):
Lactate dehydrogenase of tears and corneal epithelium.
Exp Eye Res. **20**(2), 129-133.
- KASWAN, R.L. (1984):
Keratokonjunctivitis sicca: Histopathologic study of nictitating membrane and lacrimal glands from 28 dogs.
Am J Vet Res. **45**(1), 112-118.
- KASWAN, R.L.; MARTIN, C.L.; DAWE, D.L. (1985):
Keratoconjunctivitis sicca. Immunological evaluation of 62 canine cases.
Am J Vet Res. **46**(2), 376-383.
- KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A.; WARD, D.A. (1989):
Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca.
Arch Ophthalmol. **107**(8), 1210-1216.
- KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A. (1990):
A new perspective on canine keratoconjunctivitis sicca. Treatment with ophthalmic cyclosporine.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. **20**(3), 583-613.
- KASWAN, R.L.; SALISBURY, M.A.; LOTHROP, C.D. (1991):
Interaction of age and gender on occurrence of canine keratoconjunctivitis sicca.
Prog Vet Comp Ophthalmol. **1**(2), 93-97.

- KERN, T.J.; HOLLIS, N.E. (1987):
Facial neuropathy in dogs and cats: 95 cases (1975-85).
J Am Vet Med Assoc. **191**(12), 1604-1906.
- KIM, J.; FOULKS, G.N. (1999):
Evaluation of the effect of lissamine green and rose bengal on human corneal epithelial cells.
Cornea **18**(3), 328-332.
- KIM, E.C.; CHOI, J.S.; JOO, C.K. (2009):
A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0,05% eye drops for treatment of dry eye syndrome.
Am J Ophthalmol. **147**(2), 206-213.
- KING-SMITH, P.E.; FINK, B.A.; FOGT, N.; NICHOLS, K.K.; HILL, R.M.; WILSON, G.S. (2000):
The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **41**(11), 3348-3359.
- KINOSHITA, S.; UETA, M. (2010):
Innate immunity of the ocular surface.
Jpn J Ophthalmol. **54**(3), 194-198.
- KITAOKA, M.; NAKAZAWA, M.; HAYASAKA, S. (1985):
Lysosomal enzymes in human tear fluid collected by filter paper strips.
Exp Eye Res. **41**(3), 259-265.
- KLAUSS, G.; GIULIANO, E.A.; MOORE, C.P.; STUHR, C.M.; MARTIN, S.L.; TYLER, J.W.; FITZGERALD, K.E.; CRAWFORD, D.A. (2007):
Keratoconjunctivitis sicca associated with administration of etodolac in dogs: 211 cases (1992-2002).
J Am Vet Med Assoc. **230**(4), 541-547.
- KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H.; JONES, L. (2007):
Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology.
Ocul Surf. **5**(3), 228-239.
- KNOP, E.; KNOP, N. (2001):
Lacrimal drainage-associated lymphoid tissue (LDALT): a part of the human mucosal immune system.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **42**(3), 566-574.
- KNOP, E.; N. KNOP (2003):
Augen-assoziiertes lymphatisches Gewebe (EALT) durchzieht die Augenoberfläche kontinuierlich von der Tränendrüse bis in die ableitenden Tränenwege.
Ophthalmologie **100**(11), 929-942.
- KNOP, E., KNOP, N. (2005):
The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection.
J Anat. **206**(3), 271-285.
- KORTH, R.M.E.; BOROWIAK, A.M.; ARNDT, G.; EULE, C. (2009):
Tear film osmolarity in healthy dogs.
Vet Ophthalmol., **12**(6), 385.
- KOVACS, I.; LUDANY, A.; KÖSZEGI, T.; FEHER, J.; KOVACS, B.; SZOLCSANYI, J.; PINTER, E. (2005):
Substance P released from sensory nerve endings influences tear secretion and goblet cell function in the rat.
Neuropeptides **39**(4), 395-402.
- KRENZER, K.K.; DANA, M.R.; ULLMAN, M.D.; CERMAK, J.M.; TOLLS, D.B.; EVANS, J.E.; SULLIVAN, D.A. (2000):
Effect of androgen deficiency on human meibomian gland and ocular surface.
J Clin Endocrinol Metabol. **85**(12), 4874-4882.

- KUNERT, K.S.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. (2002):
Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine.
Arch Ophthalmol. **120**(3), 330-337.
- LAMBIASE, A.; MICERA, A.; PELLEGRINI, G.; MERLO, D.; RAMA, P.; DE LUCA, M.; BONINI, S.; BONINI, S. (2009):
In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucin gene expression.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **50**(10), 4622-4630.
- LAUEMA, A.I.; SURBER, C.; MAIBACH, H.I. (1997):
Absorption of topical tacrolimus (FK506) in vitro through human skin: comparison with cyclosporin A.
Skin Pharmacol. **10**(5-6), 230-240.
- LABETOULLE, M.; MARIETTE, X.; JOVEAU, L.; BAUDOUIN, C.; KIRSCH, O.; OFFRET, H.; FRAU, E. (2002):
The phenol red thread first results for the assessment of the cut-off value in ocular sicca syndrome.
J Fr Ophthalmol. **25**(7), 674-680.
- LEHTOSALO, J.; UUSITALO, H.; MAHRBERG, T.; PANULA, P.; PALKAMA, A. (1987):
Enkephalin-like immunoreactive nerve fibers in the lacrimal gland of the guinea pig.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **28**, Suppl. 23, 2.
- LEMP, M.A.; BLACKMAN, H.J. (1981):
Ocular surface defense mechanisms.
Ann Ophthalmol. **13**(1), 61-63.
- LENNON, J.J. (1997):
Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
Abgerufen am 25.08.2011 um 13.15,
von <http://www.abrf.org/ABRFNews/1997/June1997/jun97lennon.html>
- LEVIN, M.H.; VERKMAN, A.S. (2006):
Aquaporins and CFTR in ocular epithelial fluid transport.
J Membrane Biol. **210**(2), 105-115.
- LINEK, M.; LINEK, J.; KAPS, S.; MECKLENBURG, L. (2007):
Cyclosporin A: Ein Überblick über Anwendung, Wirksamkeit und Sicherheit bei Hunden.
Tierärztl. Praxis. **35**(5), 333-343.
- LOTTSPREICH, F.; ENGELS, W.J. (2006):
Bioanalytik.
Heidelberg: Spektrum. ISBN: 978-3-8274-1520-2.
- LUDDERS, J.W.; HEAVNER, J.E. (1979):
Effect of atropine on tear formation in anesthetized dogs.
J Am Vet Med Assoc. **175**(6), 585-586.
- LUENSMANN, D.; JONES, L. (2008):
Albumin adsorption to contact lens materials: a review.
Cont Lens Anterior Eye. **31**(4), 179-187.
- LUHTALA, J.; UUSITALO, H. (1991):
The distribution and origin of substance P immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva.
Exp Eye Res. **53**(5), 641-646.
- LUHTALA, J.; PALKAMA, A.; UUSITALO, H. (1991):
Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **32**(3), 640-645.

- LUO, F.; ZHANG, H.; SUN, X. (2001):
The change of tear secretion and tear film stability in castrated male rabbits.
Zhonghua Yan Ke Za Zhi. **37**(6), 458-461.
- MAGRANE, W.G.; DORR, G. (1973):
Aus: *Veterinary Ophthalmology*,
Philadelphia (u.a.): Lippincott. ISBN 978-0-7817-6657-9.149-176.
- MANNING, F.J.; WEHRLY, S.R.; FOULKS, G.N. (1995):
Patient tolerance and ocular surface staining characteristics of lissamine green versus rose bengal.
Ophthalmology **102**(12), 1953-1957.
- MANTELLI, F.; MORETTI, C.; MICERA, A.; BONINI, S. (2007):
Conjunctival mucin deficiency in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS).
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. **245**(6), 899-902.
- MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J.; FLORCZAK, J.L. (2001):
Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **42**(10), 2242-2251.
- MARTIN, C.L.; KASWAN, R. (1984):
Distemper-associated keratoconjunctivitis sicca.
J Am Hosp Assoc. **21**, 355-359.
- MARTIN, C.L.; MUNNELL, J.; KASWAN, R. (1988):
Normal ultrastructure and histochemical characteristics of canine lacrimal glands.
Am J Vet Res. **49**(9), 1566-1572.
- MATSUDA, S.; KOYASU, S. (2000):
Mechanisms of action of cyclosporine.
Immunopharmacology **47**(2-3), 119-125.
- McCULLEY, J.P.; SHINE, W.E. (1997):
A compositional based model for the tear film lipid layer.
Trans Am Ophthalmol Soc. **95**, 79-88.
- McCULLEY, J.P.; SHINE, W.E. (2002):
Meibomian gland and tear film lipids: structure, function and control.
Adv Exp Med Biol. **506**, 373-378.
- McDERMOTT, A.M. (2004):
Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface.
Ocul Surf. **2**(4), 229-247.
- McDONALD, J.E. (1968):
Surface phenomena of tear films.
Trans Am Ophthalmol Soc. **66**, 905-939.
- McKOWN, R.L.; WANG, N.; RAAB, R.W.; KARNATI, R.; ZHANG, Y.; WILLIAMS, P.B.; LAURIE, G.W. (2009):
Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit.
Exp Eye Res. **88**(5), 848-858.
- MEINGASSNER, J.G.; GRASSBERGER, M.; FAHRNGRUBER, H.; MOORE, H.D.; SCHUURMAN, H.; STUTZ, A. (1997):
A novel anti-inflammatory drug, SDZ ASM 981, for the topical and oral treatment of skin diseases: in vivo pharmacology.
Br J Dermatol. **137**(4), 568-576.

- MENGHER, L.S.; BRON, A.J.; TONGE, S.R.; GILBERT, D.J. (1985):
A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability.
Curr Eye Res. **4**(1), 1-7.
- MESSMER, E.M. (2007):
Osmoprotektion als therapeutisches Prinzip.
Ophthalmologe. **104**(11), 987-990.
- MESTECKY, J. (1988):
Immunobiology of IgA.
Am J Kidney Dis. **12**(5), 378-383.
- MIANO, F.; CALCARA, M.; MILLAR, T.J.; ENEA, V. (2005):
Insertion of tear proteins into a meibomian lipids film.
Colloids Surf B Biointerfaces. **44**(1), 49-55.
- MISHIMA, S. (1965):
Some physical aspects of the precorneal tear film.
Arch Ophthalmol. **73**, 233.
- MILLAR, T.J.; MUDGIL, P.; BUTOVICH, I.A.; PALANIAPPAN, C.K. (2009):
Adsorption of human tear lipocalin to human meibomian lipid films.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **50**(1), 140-151.
- MIRCHEFF, A.K. (1989):
Lacrimal fluid and electrolyte secretion: a review.
Curr Eye Res. **8**(6), 607-617.
- MIRCHEFF, A.K. (1994):
Water and electrolyte secretion and fluid modification.
In: *Principles & Practice of Ophthalmology*,
Philadelphia (u.a.) Elsevier Saunders. ISBN: 1-4160-0016-X. 466-472.
- MIRCHEFF, A.K.; GIEROW, J.P.; WOOD, R.L. (1994):
Autoimmunity of the lacrimal gland.
Int Ophthalmol Clin. **34**(1), 1-18.
- MIRCHEFF, A.K.; WARREN, D.W.; WOOD, R.L.; TORTORIELLO, P.J.; KASWAN, R.L. (1992):
Prolactin localization, binding and effects on peroxidase release in rat exorbital lacrimal gland.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **33**(3), 641-650.
- MONIAUX, N.; ESCANDE, F.; PORCHET, N.; AUBERT, J.P.; BATRA, S.K. (2001):
Structural organization and classification of the human mucin genes.
Front Biosci. **1**(6), 1192-1206.
- MOORE, C.P. (1998):
Advances in the treatment of dry eye.
Proceedings at the Symposium at the North American Veterinary Conference, Florida. 17-22.
- MOORE, C.P. (2004):
Immunomodulating agents.
Vet Clin Small Anim. **34**(3), 725-737.
- MOORE, J.C.; TIFFANY, J.M. (1979):
Human ocular mucus. Origins and preliminary characterisation.
Exp Eye Res. **29**(3), 291-301.
- MOORE, C.P.; COLLIER, L.L. (1990):
Ocular surface disease associated with loss of conjunctival goblet cells in dogs.
J Am Anim Hosp Assoc. **26**, 458-466.

- MOORE, C.P.; McHUGH, J.B.; THORNE, J.G.; PHILLIPS, T.E. (2001):
Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **42**(3), 653-659.
- MOORE, C.P.; NORMAN, J.; WILSMAN, E.; NORDHEIM, L.; MAJORS, J.; COLLIER, L.L. (1987):
Density and distribution of canine conjunctival goblet cells.
Ophthalmol Vis Sci. **28**(12), 1925-1932.
- MORGAN, R.V.; BACHRACH, A. (1982):
Keratoconjunctivitis sicca associated with sulfonamide therapy in dogs.
J Am Vet Med Assoc. **180**(4), 432-434.
- MUDGIL, P.; TORRES, M.; MILLAR, T.J. (2006):
Absorption of lysozyme to phospholipids and meibomian lipid monolayer films.
Colloids Surf B Biointerfaces. **48**(2), 128-137.
- MUELLER, L.J.; MARFURT, C.F.; KRUSE, F. (2003):
Corneal nerves: structure, contents and function.
Exp Eye Res. **76**(5), 521-542.
- NAGYMIHALYI, A.; DIKSTEIN, S.; TIFFANY, J.M. (2004):
The influence of eyelid temperature on the delivery of meibomian oil.
Exp Eye Res. **78**(3), 367-370.
- NAKAMURA, Y.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S. (1998):
Inflammatory cytokines in normal human tears.
Curr Eye Res. **17**(6), 673-676.
- NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; LEIVA, M.; ROURA, X.; PENA, T. (2005):
Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis.
Vet Parasitol. **133**(1), 37-47.
- NELL, B.; WALDE, I.; BILLICH, A.; VIT, P.; MEINGASSNER, J.G. (2005):
The effect of topical pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from an exploratory study.
Vet Ophthalmol. **8**(1), 39-46.
- NICHOLS, B.A.; CHIAPPINO, M.L.; DAWSON, C.R. (1985):
Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **26**(4), 464-473.
- NICHOLS, J.J.; NICHOLS, K.K.; PUENT, B.; SARACINO, M.; MITCHELL, G.L. (2002):
Evaluation of tear film interference patterns and measure of tear break-up time.
Optom Vis Sci. **79**(6), 363-369.
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. (2003):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV.
Stuttgart (u.a.): Enke. ISBN: 978-3-8304-4150-2
- NIEUW-AMERONGEN, A.V.; BOLSHER, J.G.M.; VEERMAN, E.C.I. (1995):
Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity.
Glycobiology **5**(8), 733-740.
- NORN, M.S. (1969):
Desiccation of the precorneal film, I: corneal wetting time.
Acta Ophthalmol. **47**(4), 865-880.

- OEN, H.; CHENG, P.; TURNER, H.C.; ALVAREZ, L.J.; CANDIA, O.A. (2006):
Identification and localization of aquaporin 5 in the mammalian conjunctival epithelium.
Exp Eye Res. **83**(4), 995-998.
- OFRI, R.; LAMBROU, G.N.; ALLGOEWER, I.; GRAENITZ, U.; PENA, T.M.; SPIESS, B.M.; LATOUR, E. (2007a):
Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A.
Vet J. **179**(1), 70-77.
- OFRI, R.; ORGAD, K.; KASS P.H.; DIKSTEIN, S. (2007b):
Canine meibometry: Establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs.
Vet J. **174**(3), 536-540.
- OHASHI, Y.; DOGRU, M.; TSUBOTA, K. (2006):
Laboratory findings in tear fluid analysis.
Clin Chim Acta. **369**(1), 17-28.
- OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C.; BARRIE, K.P.; KALLBERG, M.E.; PLUMMER, C.E.; O'REILL, S.; GELATT, K.N.; BROOKS, D.E. (2007):
Proteinases of the cornea and precocular tear film.
Vet Ophthalmol. **10**(4), 199-206.
- OPREA, L.; TILBERGHIEN, A.; CREUZOT-GARCHER, C.; BAUDOUIN, C. (2004):
Hormonal regulatory influence in tear film.
J Fr Ophthalmol. **27**(8), 933-941.
- PALIWAL, A.; DE, P.K. (2006):
Marked sexual dimorphism of lacrimal gland peroxidase in hamster: regression by androgens and estrogens.
Biochem Biophys Res Commun. **341**(4), 1286-1293.
- PAULSEN, F.P.; CORFIELD, A.P.; HINZ, M.; HOFFMANN, W.; SCHAUDIG, U.; THALE, A.B.; BERRY, M. (2003):
Characterisation of muzins in human lacrimal sac and nasolacrimal duct.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **44**(5), 1807-1813.
- PAULSEN, F.P.; HINZ, M.; SCHAUDIG, U.; THALE, A.B.; HOFFMANN, W. (2002):
TFF peptides in the human efferent tear ducts.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **43**(11), 3359-3364.
- PENA, M.T.; LEIVA, M. (2008):
Canine conjunctivitis and blepharitis.
Vet Clin North Am Small Anim Pract. **38**(2), 233-249.
- PENA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. (2000):
Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998).
Vet Ophthalmol. **3**(1), 35-41.
- PEPPARD, J.V.; MONTGOMERY, P.C. (1987):
Studies on the origin and composition of IgA in rat tears.
Immunology **62**(2), 193-198.
- PERAL, A.; LOMA, P.; YERXA, B.; PINTOR, J. (2008):
Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears.
Clin Ophthalmol. **2**(2), 261-267.
- PERRA, M.T.; SERRA, A.; SIRIGU, P.; TURNO, F. (1995):
A histochemical and immunohistochemical study of certain defense mechanisms in the human lacrimal sac epithelium.
Arch Histol Cytol. **58**(5), 517-522.

PERRY, H.D. (2008):

Dry eye disease: pathophysiology, classification and diagnosis.
Am J Manag Care. **14**(3), 79-87.

PETRI, J.B.; SCHURK, S.; GEBAUER, S.; HAUSTEIN, U.F. (1998):

Cyclosporine A delays wound healing and apoptosis and suppresses activin beta-A expression in rats.
Eur J Dermatol. **8**(2), 104-113.

PFLUGFELDER, S.C.; SOLOMON, A.; DURSUN, D. (2002):

Dry eye and delayed tear clearance: „a call to arms“.
Adv Exp Med Biol. **506**, 739-743.

PIETSCH, R.L.; PEARLMAN, M.E. (1973):

Human tear lysozyme variables.
Arch Ophthalmol. **90**(2), 94-96.

POLACK, F.M. (1982):

The treatment of dry eyes with natriumhyaluronate.
Cornea **1**(2), 133-136.

PRYDAL, J.I.; ARTAL, P.; WOON, H.; CAMPBELL, F.W. (1992):

Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **33**(6), 2006-2011.

QU, X.D.; LEHRER, R.I. (1998):

Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears.
Infect Immun. **66**(6), 2791-2797.

RASHID, S.; JIN, Y.; ECOIFFIER, T.; BARABINO, S.; SCHAUMBERG, D.A.; DANA, M.R. (2008):

Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye.
Arch Ophthalmol. **126**(2), 219-225.

REDL, B. (2000):

Human tear lipocalin.
Biochim Biophys Acta. **1482**(1-2), 241-248.

ROBERTS, S.R.; ERICKSON, O.F. (1962):

Dog tear secretion and tear proteins.
J Small Anim Pract. **3**(1-5), 3.

ROBERTS, S.M.; LAVACH, J.D.; SEVERIN, G.A.; WITHROW, J.S.; GILLETTE, E.L. (1987):

Ophthalmic complications following megavoltage irradiation of the nasal and paranasal cavities in dogs.
J Am Vet Med Assoc. **190**(1), 43-47.

ROCHA, E.M.; WICKHAM, L.A.; DA SILVEIRA, L.A. (2000):

Identification of androgen receptor protein and 5alpha-reductas mRNA in human ocular tissues.
Br J Ophthalmol. **84**(1), 76-84.

ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. (2001):

The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease.
Surv Ophthalmol. **45**(2), 203-210.

ROYLE, L.; MATTHEWS, E.; CORFIELD, A.; BERRY, M.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; CARRINGTON, S.D. (2008):

Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences.
Glycoconj J. **25**(8), 763-773.

- RUAN, X.; CHODOSH, J.; CALLEGAN, M.C.; BOOTH, M.C.; LEE, T.D.; KUMAR, P.; GILMORE, M.S.; PEREIRA, H.A. (2002):
Corneal expression of the inflammatory mediator CAP 37.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **43**(5), 1414-1421.
- RUBIN, L.F.; AGUIRRE, G. (1967):
Clinical use of pilocarpin for keratoconjunctivitis sicca in dogs and cats.
J Am Vet Med Assoc. **151**(3), 313-320.
- RUBIN, L.F.; LYNCH, R.K.; STOCKMAN, W.S. (1965):
Clinical estimation of lacrimal function in dogs.
J Am Vet Med Assoc. **147**(9), 946-947.
- SAAREN-SEPPÄLÄ, H.; JAUHAINEN, M.; TERVO, T.M.T.; REDL, B.; KINNUNEN, P.K.J.; HOLOPAINEN, J.M. (2005):
Interaction of purified tear lipocalin with lipid membranes.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **46**(10), 3649-3656.
- SAITO, A.; IZUMISAWA, Y.; YAMASHITA, K.; KOTANI, T. (2001):
The effect of the third eyelid gland removal on the ocular surface of dogs.
Vet Ophthalmol. **4**(1), 13-18.
- SALISBURY, M.A.; KASWAN, R.L. (1990):
Keratoconjunctivitis sicca in dogs.
Vet Med Rep. **2**, 115-127.
- SALISBURY, M.A.; KASWAN, R.L.; WARD, D.A.; MARTIN, C.L.; RAMSEY, J.M.; FISCHER, C.A. (1990):
Topical application of cyclosporine in the management of keratoconjunctivitis sicca in dogs.
J Am Anim Hosp Assoc. **26**, 269-74.
- SANCHEZ, R.F.; INNOCENT, G.; MOULD, J.; BILLSON, F.M. (2007):
Canine keratoconjunctivitis sicca: disease trends in a review of 229 cases.
J Small Anim Pract. **48**(4), 211-217.
- SANCHEZ, R.F.; MELLOR, D.; MOULD, J. (2006):
Effects of medetomidine and medetomidine-butorphanol combination on Schirmer tear test 1 readings in dogs.
Vet Ophthalmol. **9**(1), 33-37.
- SANSOM, J.; BARNETT, K.C. (1985):
Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases.
J Small Anim Pract. **26**, 121-131.
- SANSOM, J.; BARNETT, K.C.; NEUMANN, W.; SCHULTE-NEUMANN A.; CLERC, B.; JEGOU, J.P.; DE HAAS, V.; WEINGARTEN, A. (1995):
Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical field trial.
Vet Rec. **137**(20), 504-507.
- SATOR, M.O.; JOURA, E.A.; GOLASZEWSKI, T.; GRUBER, D.; FRIGO, P.; METKA, M.; HOMMER, A.; HUBER, J.C. (1998):
Treatment of menopausal keratoconjunctivitis sicca with topical oestradiol.
Br J Obstet Gynaecol. **105**(1), 100-102.
- SCHARGUS, M.; GEERLING, G. (2009):
Das "feuchte" trockene Auge.
Ophthalmologie **106**(3), 235-241.

SCHIRRA, F.; SUZUKI, T.; RICHARDS, S.M.; JENSEN, R.V.; LIU, M.; LOMBARDI, M.J.; ROWLEY, P.; TREISTER, N.S.; SULLIVAN, D.A. (2005):

Androgen control of gene expression in the mouse meibomian gland.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **46**(10), 3666-3675.

SCHLEGEL, T.; BREHM, H.; AMSELGRUBER, W.M. (2003):

IgA and secretory component (SC) in the third eyelid of domestic animals: a comparative study.
Vet Ophthalmol. **6**(2), 157-161.

SCHMIDT, G.; MAGRANE, W.G.; HELPER, L.C. (1979):

Parotid duct transposition: A follow-up study of 60 eyes.
J Am Anim Hosp Assoc. **6**, 235-241.

SCHREIBER, S.L.; CRABTREE, G.R. (1992):

The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.
Immunol Today. **13**(4), 136-141.

SEAMON, V.; VELLALA, K.; ZYLBERBERG, C.; PONAMAREVA, O.; AZZAROLO, A.M. (2008):

Sex hormone regulation of tear lipocalin in the rabbit lacrimal gland.
Exp Eye Res. **87**(3), 184-190.

SHACKLEFORD, J.M.; KLAPPER, C.E. (1962):

A sexual dimorphism of hamster submaxillary mucin.
Anat Rec. **142**, 495-503.

SHATOS, M.A.; RIOS, J.D.; HORIKWA, Y.; HODGES, R.R.; CHANG, E.L.; BERNARDINO, C.R.; RUBIN, P.A.D.; DARTT, D.A. (2003):

Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **44**(6), 2477-2486.

SHEEHAN, J.K.; BRAZEAU, C.; KUTAY, S.; PIGEON, H.; KIRKHAM, S.; HOWARD, M.; THORNTON, D.J. (2000):

Physical characterization of the MUC5AC mucin: a highly oligomeric glycoprotein whether isolated from cell culture or in vivo from respiratory mucous secretions.
Biochem J. **347**(1), 37-44.

SITARAMAMMA, T.; SHIVAJI, S.; RAO, G.N. (1998):

Effect of storage on protein concentration of tear samples.
Curr Eye Res. **17**(10), 1027-1035.

SMITH, V.A.; KHAN-LIM, D.; ANDERSON, L.; COOK, S.D.; DICK, A.D. (2008):

Does orally administered doxycycline reach the tear film?
Br J Ophthalmol. **92**(6), 856-859.

SMITH, P.; KROHN, R.; HERMANSON, G.; MALLIA, A.; GARTNER, F.; PROVENZANO, M.; FUJIMOTO, E.; GOEKE, N.; OLSON, B.; KLENK, D. (1985):

Measurement of protein using bicinchonic acid.
Anal Biochem. **150**(1), 76-85.

SMITH, E.M.; BUYUKMIHCI, N.C.; FARVER, T.B. (1994):

Effect of topical pilocarpine treatment on tear production in dogs.
J Anim Vet Med Assoc. **205**(9), 1286-1289.

SNYDER, D.S.; BELLER, D.I.; UNANUE, E.R. (1982):

Prostaglandins modulate macrophage Ia expression.
Nature **299**(5879), 163-165.

SPECIAN, R.D.; NEUTRA, M.R. (1980):

Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine.
J Cell Biol. **85**(3), 626-640.

- SPIESS, B. (1998):
Schirmer-Tränen-Test: Wann man ihn einsetzt, wie man ihn durchführt, was ihn beeinflusst.
Kleintier konkret, **3**, 14-18.
- SPURR-MICHAUD, S.; ARGÜESO, P.; GIPSON, I. (2007):
Assay of mucins in human tear fluid.
Exp Eye Res. **84**(5), 939-950.
- STADES, F.C., NEUMANN, W.; BOEVE, M.H.; SPIESS, B.; WYMAN, M. (2006):
Praktische Augenheilkunde für den Tierarzt.
Hannover: Schlütersche. ISBN: 978-3-89993-001-6.
- STERN, M.E.; BEUERMANN, R.W.; FOX, R.I. (1998):
The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands.
Cornea **17**(6), 584-589.
- STEUHL, K.P. (2001):
Anatomie der Bindehaut
In: Trockenes Auge.
Heidelberg: Kaden. ISBN 3-922777-50-3.
- STRONG, B.; FARLEY, W.; STERN, M.E.; PFLUGFELDER, S.C. (2005):
Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratokconjunctivitis sicca.
Cornea **24**(1), 80-85.
- STRUBBE, D.T.; BROOKS, D.E.; SCHULTZ, G.S.; WILLIS-GOULET, H.; GELATT, K.N.; ANDREW, S.E.;
KALLBERG, M.E.; MAC KAY, E.O.; COLLANTE, W.R. (2000):
Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis.
Vet Ophthalmol. **3**(2-3), 111-119.
- STUCHELL, R.N.; FELDMAN, J.J.; FARRIS, R.L.; MANDEL, U.I.D. (1984):
The effect of collection technique on tear composition.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **25**(3), 374-377.
- SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. (2003):
A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics.
Anal Bioanal Chem. **376**(7), 952-965.
- SULLIVAN, D.A.; ALLANSMITH, M.R. (1984):
Source of IgA in tears of rats.
Immunology **53**(4), 791-799.
- SULLIVAN, D.A.; HANN, L.E. (1989):
Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal accumulation
and secretion of IgA and IgG.
J Steroid Biochem. **34**(1-6), 253-262.
- SULLIVAN, D.A.; HANN, L.E.; YEE, L.; ALLANSMITH, M.R. (1990):
Age and gender-related influence on the lacrimal gland and tears.
Acta Ophthalmol. **68**(2), 188-194.
- SULLIVAN, D.A.; JENSEN, R.V.; SUZUKI, T.; RICHARDS, S.M. (2009):
Do sex steroids exert sex-specific and/or opposite effects on gene expression in lacrimal and meibomian glands?
Mol Vis. **10**(15), 1553-1572.
- SULLIVAN, D.A.; SULLIVAN, B.D.; EVANS, J.E.; SCHIRRA, F.; YAMAGAMI, H.; LIU, M.; RICHARDS,
S.M.; SUZUKI, T.; SCHAUMBERG, D.A.; SULLIVAN, R.M.; DANA, M.R. (2002):
Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye.
Ann N Y Acad Sci. **966**, 211-222.

- SULLIVAN, D.A.; SULLIVAN, B.D.; ULLMAN, M.D.; ROCHA, E.M.; KRENZER, K.L.; CERMAK, J.M.; TODA, I.; DOANE, M.G.; EVANS, J.E.; WICKHAM, L.A. (2000):
Androgen influence on the meibomian gland.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **41**(12), 3732-3742.
- SUZUKI, T.; SCHIRRA, F.; RICHARDS, S.M.; TREISTER, N.S.; LOMBARDI, M.J.; ROWLEY, P.; JENSEN, R.V.; SULLIVAN, D.A. (2006):
Estrogen's and progesterone's impact on gene expression in the mouse lacrimal gland.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **47**(1), 158-168.
- TEI, M.; MOCCIA, R.; GIPSON, I.K. (1999):
Developmental expression of mucin genes ASGP (rMuc4) and rMuc5AC by the rat ocular surface epithelium.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **40**(9), 1944-1951.
- TEI, M.; SPURR-MICHAUD, S.J.; TISDALE, A.S.; GIPSON, I.K. (2000):
Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **41**(1), 82-88.
- TIFFANY, J.M.; WINTER, N.; BLISS, G. (1989):
Tear film stability and tear surface tension.
Curr Eye Res. **8**(5), 507-515.
- TIFFANY, J.M.; NAGYOVA, B. (2002):
The role of lipocalin in determining the physical properties of tears.
Adv Exp Med Biol. **506**, 581-585.
- TODA, I.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. (1995):
Dry eye with only decreased tear break-up time is sometimes associated with allergic conjunctivitis.
Ophthalmology **102**(2), 302-309.
- TREPANIER, L.A. (2004):
Idiosyncratic toxicity associated with potentiated sulfonamides in the dog.
J Vet Pharmacol Ther. **27**(3), 129-138.
- TSCHÖRNER, F. (2008):
Weiterentwicklung einer Software zum automatisierten Proteinprofilings massenspektrometrischer Daten.
Bingen, FH, Dipl., S.95.
- TSUBOTA, K.; GOTO, E.; FUJITA, H. (1999):
Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome.
Br J Ophthalmol. **83**(4), 390-395.
- TWINING, S.S.; FUKUCHI, T.; YUE, B.Y.; WILSON, P.M.; ZHOU, X.; LOUSHIN, G. (1994):
Alpha 2-macroglobulin is present in and synthesized by the cornea.
Invest Ophthalmol Vis Sci. **35**(8), 3226-3233.
- UNRATH, K. (2008):
ProteinChip-Analyse von Tränenflüssigkeit mittels Surface-enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass-spectrometry und Optimierung der Probenvorbereitung für massenspektrometrische Messungen.
Mainz, Johannes-Gutenberg-Univ., Diss., S. 123.
- URBAN, M.; WYMAN, M.; RHEINS, M.; MARRARO, R. (1972):
Conjunctival flora of clinically normal dogs.
J Am Vet Med Assoc. **161**(2), 201-207.
- VAN DER WOERDT, A.; ADAMCAK, A. (2000):
Comparison of absorptive capacities of original and modified Schirmer tear test strips in dogs.
J Am Vet Med Assoc. **216**(10), 1576-1577.

- VAN HAERINGEN, N.J. (1981):
Clinical biochemistry of tears.
Surv Ophthalmol. **26**(2), 84-96.
- VAN HAERINGEN, N.J.; ENSINK, F.; GLASIUS, E. (1975):
Amylase in human tear fluid: origin and characteristics, compared with salivary and urinary amylases.
Exp Eye Res. **21**(4), 395-403.
- VAN HAERINGEN, N.J.; ENSINK, F.; GLASIUS, E. (1979):
The peroxidase-thiocyanate-hydrogenperoxide system in tear fluid and saliva of different species.
Exp Eye Res. **28**(3) 343-347.
- VERDUGO, P. (1991):
Mucin exocytosis.
Am Rev Respir Dis. **144**(3), 33-37.
- VERSURA, P.; MALTARELLO, M.C.; CARAMAZZA, R.; LASCHI, R. (1989):
Mucus alteration and eye dryness. A possible relationship.
Acta Ophthalmol. **67**(4), 455-464.
- WAGNER, F.; HEIDER, H.-J. (1997):
Folgen der Resektion des dritten Augenlides beim Hund.
Prakt. Tierarzt **78**(11), 987-994.
- WALDE, I.; SCHÄFFER, E.H.; KÖSTLIN, R.G.; NELL, B. (2008):
Atlas der Augenheilkunde.
Stuttgart: Schattauer. ISBN: 978-3-7945-2307-8
- WEBER, A. (2006):
MALDI-Methoden.
Abgerufen am: 28.08.2011 um 13.30 UHR,
von [http:// www.uni-stuttgart.de/igvt/SS06/MALDI_Methoden_110506.pdf](http://www.uni-stuttgart.de/igvt/SS06/MALDI_Methoden_110506.pdf)
- WEINBERG, E.D. (2001):
Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential.
J Pharm Pharmacol. **53**(10), 1303-1310.
- WESTERMEYER, H.D.; WARD, D.A.; ABRAMS, K. (2009):
Breed predisposition to congenital alacrima in dogs.
Vet Ophthalmol. **12**(1), 1-5.
- WICKHAM, L.A.; GAO, J.; TODA, I.; ROCHA, E.M.; ONO, M.; SULLIVAN, D.A. (2000):
Identification of androgen, estrogen and progesteron receptor mRNAs in the eye.
Acta Ophthalmol Scand. **78**(2), 146-153.
- WILKIE, D.A.; WOLF, E.D. (1990):
Sulfonamides and keratoconjunctivitis sicca.
J Am Vet Med Assoc. **196**(4), 521-522.
- WILLIAMS, D.L. (2002):
Use of punctal occlusion in the treatment of canine keratoconjunctivitis sicca.
J Small Anim Pract. **43**(11), 478-481.
- WILLIAMS, D.L. (2005a):
Analysis of tear uptake by the Schirmer tear test strip in the canine eye.
Vet Ophthalmol. **8**(5), 325-330.

WILLIAMS, D.L. (2005b):

Major histocompatibility class II expression in the normal canine cornea and in canine chronic superficial keratitis.

Vet Ophthalmol. **8**(6), 395-400.

WILLIAMS, D.L.; PIERCE, V.; MELLOR, P.; HEATH, M.F. (2007):

Reduced tear production in three canine endocrinopathies.

J Small Anim Pract. **48**(5), 252-256.

WILLIAMS, S.J.; WRESCHNER, D.H.; TRAN, M.; EYRE, H.J.; SUTHERLAND, G.R.; MCGUCKIN, M.A. (2001):

MUC13-a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells.

J Biol Chem. **276**(21), 18327-18336.

WISE, L.A.; LAPPIN, M.R. (1991):

A syndrome resembling feline dysautonomia (Key-Gaskell syndrome) in a dog.

J Am Vet Med Assoc. **198**(12), 2103-2106.

WOO, H.M.; BENTLEY, E.; CAMPBELL, S. F.; MARFURT, C.F.; MURPHY, C.J. (2005):

Nerve growth factor and corneal wound healing in dogs.

Exp Eye Res. **80**(5), 633-642.

WOOD, R.L.; ZHANG, J.; HUANG, Z.M.; GIEROW, J.P.; SCHECHTER, J.E.; MIRCHEFF, A.K.; WARREN, D.W. (1999):

Prolactin and prolactin receptors in the lacrimal gland.

Exp Eye Res. **69**(2), 213-226.

WORDA, C.; NEPP, J.; HUBER, J.C.; SATOR, M.O. (2001):

Treatment of keratoconjunctivitis sicca with topical androgen.

Maturitas **37**(3), 209-212.

WYMAN, M.; GILGER, B.; MUELLER, P. (1995):

Clinical evaluation of a new Schirmer tear test in the dog.

Vet Comp Ophthalmol. **5**, 211-214.

YAMADA, M.; MOCHIZUKI, H.; KAWAI, M.; TSUBOTA, K.; BRYCE, T.J. (2005):

Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction.

Br J Ophthalmol. **89**(7), 803-805.

YAMADA, M.; OGATA, M.; KAWAI, M.; MASHIMA, Y.; NISHIDA, T. (2002):

Substance P and its metabolites in normal human tears.

Invest Ophthalmol Vis Sci. **43**(8), 2622-2625.

YAMAGAMI, S.; USUI, T.; AMANO, S.; EBIHARA, N. (2005):

Bone marrow-derived cells in mouse and human cornea.

Cornea **24**(8), 71-74.

ZIERHUT, M.; DANA, M.R.; STERN, M.E.; SULLIVAN, D.A. (2002):

Immunology of the lacrimal gland and ocular tear film.

Trends Immunol. **23**(7), 333-335.

ZYLBERBERG, C.; SEAMON, V.; PONOMAREVA, O.; VELLALA, K.; DEIGHAN, M.; AZZAROLO, A.M. (2007):

Estrogen up-regulation of metalloproteinase-2 and -9 expression in rabbit lacrimal glands.

Exp Eye Res. **84**(5), 960-972.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Tränenfilms (Quelle: Optima Pharmazeutische GmbH, 2012)

Abbildung 2: Model der Wege zur Stimulation der Proteinsekretion in der Tränendrüse (Quelle: DARTT, 1989)

Abbildung 3: Konzept des Augen-assoziierten lymphatischen Gewebes (EALT)

Abbildung 4: Die Tränen- und die Meibomdrüsen können durch verschiedene Störungen beeinflusst werden (Quelle: ZIERHUT et al., 2002)

Abbildung 5: Circulus vitiosus bei der Keratokonjunktivitis sicca der zu Epithelschäden und klinischen Symptomen führt (Quelle: ROLANDO u. ZIERHUT, 2001)

Abbildung 6: Farbreaktion des Bicinchinonsäure-Assays (Quelle: www.piercenet.com)

Abbildung 7: Schema der Funktionsweise des Time of Flight (TOF) Analysators mit Reflektormodus zur besseren Auflösung (Quelle: WEBER, 2006)

Abbildung 8: SELDI Rohspektrum eines gesunden Hundes

Abbildung 9: SELDI Rohspektrum eines unbehandelten, an KCS erkrankten Hundes

Abbildung 10: SELDI Rohspektrum eines klinisch augengesunden Hundes, aber mit vermindertem STT I Ergebnis

Abbildung 11: Rohspektren der verschiedenen Elutionslösungen in der MALDI-Messung

Abbildung 12: Rohspektren aus dem MALDI-TOF

Abbildung 13: Vergleich der Mittelwerte der Tränenfilmproteinintensitäten der Proben von rechten und linken Augen von gesunden Hunden (n= 81) ermittelt durch MALDI-TOF

Abbildung 14: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2079 Dalton

Abbildung 15: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2472 Dalton

Abbildung 16: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten von verschiedenen Hunderassen gemessen mit MALDI-TOF

Abbildung 17: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2079 Dalton

Abbildung 18: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

Abbildung 19: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 3019 Dalton

Abbildung 20: Berechnung der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Intensitäten des Peaks bei 2599 Dalton der verschiedenen Rassen mittels Tukey HSD Test

Abbildung 21: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten bei gesunden Hunden in Abhängigkeit vom Geschlecht gemessen mittels MALDI-TOF

Abbildung 22: Variabilität der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

Abbildung 23: Box Plot der mit MALDI-TOF gemessenen Proben bei 2599 Dalton

Abbildung 24: Vergleich der Tränenfilmproteinintensitäten gemessen mittels MALDI-TOF bei gesunden Hunden in Abhängigkeit vom Alter

Abbildung 25: MALDI-TOF Rohspektren von 5 augengesunden West Highland White Terriern

Abbildung 26: Vergleich der MALDI-TOF Rohspektren der an KCS erkrankten, unbehandelten West Highland White Terrier

Abbildung 27: Vergleich der MALDI-TOF Rohspektren von gesunden West Highland White Terriern (schwarz) mit erkrankten (rot) und mit CsA behandelten (türkis) Hunden

Abbildung 28: MALDI-TOF Rohspektren der mit 0,2%iger Cyclosporin Salbe behandelten KCS-WHWT

Abbildung 29: MALDI-TOF Rohspektren der mit 2%igen Cyclosporin Tropfen behandelten KCS-WHWT und die Probe des mit Tacrolimus behandelten KCS-WHWT

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Totalproteingehalt in der Tränenflüssigkeit von Hunden

Tabelle 2: Immunglobulingehalte in der Tränenflüssigkeit gesunder Hunde im Vergleich zum Deutschen Schäferhund nachgewiesen durch Immunelektrophorese

Tabelle 3: Immunglobulingehalte in der Tränenflüssigkeit gesunder Hunde nachgewiesen durch Immunelektrophorese

Tabelle 4: Weitere Bestandteile des wässrigen Anteils des Tränenfilms

Tabelle 5: Mögliche Einflussfaktoren auf das Ergebnis des Schirmer-Tränen-Tests

Tabelle 6: Geschlechtsspezifische Unterschiede der Tränendrüse

Tabelle 7: Einfluß und Effekte der Hormone auf den Tränenfilm

Tabelle 8: Klassifizierung der entzündlichen Läsionen im Bereich der Tränendrüse bei der KCS des Hundes

Tabelle 9: Nichtinfektiöse Ursachen der Keratokonjunktivitis sicca beim Hund

Tabelle 10: Infektiöse Ursachen der Keratokonjunktivitis sicca beim Hund

Tabelle 11: Rassedispositionen für Keratokonjunktivitis sicca (KCS)

Tabelle 12: Häufig verwendete Tränenersatzstoffe bei Mensch und Hund

Tabelle 13: Weitere Maßnahmen zur Behandlung des trockenen Auges, von denen einige noch in der klinischen Erprobung sind (aus der Human- und der Veterinärmedizin)

Tabelle 14: Anzahl der Tiere, von denen auswertbare Tränenfilmproben zur Verfügung standen innerhalb der verschiedenen Patientengruppen

Tabelle 15: Anzahl der Tiere innerhalb der verschiedenen Rassen

Tabelle 16: Anzahl der an KCS erkrankten, behandelten West Highland White Terrier

Tabelle 17: Anzahl der Proben die bereits im SELDI untersucht wurden

Tabelle 18: Zusammensetzung der verglichenen Elutionslösungen

Tabelle 19: Ermittelter Proteingehalt in Tränenflüssigkeit von Hunden nach Verwendung verschiedener Elutionslösungen

Tabelle 20: Proteingehalt in den Tränenfilmproben eluiert mit Ethanol von männlichen und weiblichen Tieren

Tabelle 21: Hunde, von denen Tränenproben ausgewertet wurden

12 ANHANG

Untersuchungsbogen für die Kontrollgruppe (gesunde Hunde)

KONTROLLGRUPPE

Name des Hundes _____

Name des Besitzers _____

Rasse _____

Geburtstag __ . __ . _____ Alter _____

Geschlecht w <input type="checkbox"/> wk <input type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/> mk <input type="checkbox"/>

Schon mal Augenprobleme gehabt? (Nickhautdrüse ex...)

Nein Ja _____

Sonstige Erkrankungen (Diabetes, Cushing, Bestrahlung....)

Nein Ja _____

Medikamente ?

Nein Ja _____

Grund der Vorstellung ? _____

STT

RECHTS _____ mm/min LINKS _____ mm/min

BUT

RECHTS _____ sec LINKS _____ sec

Augenveränderungen ?

RECHTS _____

LINKS _____

Untersuchungsbogen für erkrankte und behandelte WHWT**Besitzer**

Name _____

Adresse _____

Telefon _____

Patient

Name _____

Geburtstag __ . __ . _____ Alter _____

Geschlecht w wk m mk

Impfungen regelmäßig O Unregelmäßig O

Abstammung (Kopie)

Läufigkeitsunterdrückung ja O zuletzt _____ nein O

Letzte Läufigkeit _____

Sonstiges _____

Anamnese

Vorerkrankung wie Staupe bekannt? Ja O Nein O

Medikamentengabe (Sulfasalazin, Sulfonamid, Phenopyridine, Atropin)?

Ja O wann _____ wie lange _____ Nein O

Bestrahlung Ja O Nein O

Trauma bekannt (mit z.B. N. facialis Lähmung)? Ja O Nein O

Operative Entfernung der Nickhaut durchgeführt? Ja O re O li O Nein O

Verlegung der Tränengänge? Ja O Nein O

Häufig der Klimaanlage ausgesetzt? Ja O Nein O

Vorbehandlung der Augen mit _____

Wie lange ? _____ Erfolg ? Besser O Gleichbleibend O Schlechter O

Keine Vorbehandlung O

Weitere Erkrankungen, z.B. endokrinologische bekannt? _____

Festgestellte Symptome

Seit wann aufgefallen? _____ Zeitraum _____

Einseitig O OS O OD O Beidseitig O

Rote Augen? Ja O Nein O Dauer _____

Ausfluß? Ja O Nein O Dauer _____

Ausflußqualität serös O eitrig O mukös O

Reiben der Augen? Ja O Nein O

ANHANG

Leistungsabfall? Ja Nein

Sonstiges ? _____

Untersuchung Nummer _____ **Datum:** _____

Allgemeiner Status? Unauffällig Sonstiges _____

Hautveränderungen vorhanden ? Ja _____ Nein

Ohrenveränderungen? Ja Nein

Nasen-und Mundschleimhaut trocken? Ja Nein

	Linkes Auge	Rechtes Auge
Blepharospasmus		
Chemosis		
HH-Vaskularisation		
Hornhauttrübung		
Pigmentation		
HH-Narbenbildung		
Ausfluss		
Ausflussqualität	serös <input type="radio"/> eitrig <input type="radio"/> mukös <input type="radio"/>	serös <input type="radio"/> eitrig <input type="radio"/> mukös <input type="radio"/>

Einteilung: 0=Keine Anzeichen
1=geringgradig
2=mittelgradig
3=hochgradig
4=höchstgradig
-1=keine Angabe

Sonstiges ? _____

STT-TEST

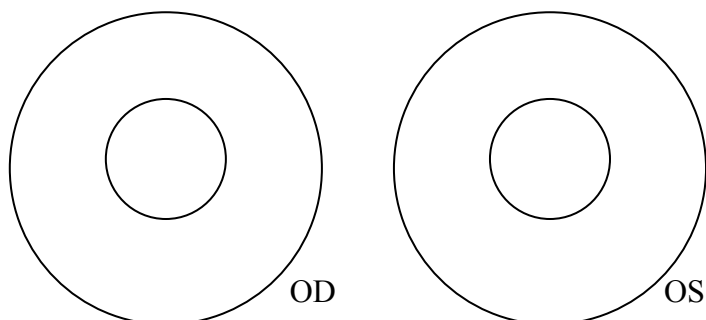
OS _____ mm/Min OD _____ mm/Min

TRÄNENFILMAUFRISSTZEIT (BUT)

OS _____ Sekunden OD _____ Sekunden

ULZERATIONEN ?

Ja Nein



Tab. 21: Hunde, von denen Tränenproben ausgewertet wurden**1.1 WHWT**

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis	Grund der Vorstellung	Medikamente
Andy	9	m	R 25 L 20	Impfung	-
Baki	9	m	R 20 L 20	OP	-
Berty	14	m	R 22 L 16	OP	Enrofloxacin
Charly	12	m	R 15 L 15	OP	-
Chira	1	wk	R 19 L 21	Durchfall	Amoxicillin
Chica	13	wk	R 20 L 22	OP	Karsivan
Derry	5	m	R 18 L 18	OP	-
Eddi	1	m	R 21 L 24	Züchterin	-
Emely	1	w	R 23 L 22	Züchterin	-
Gerry	15	w	R 20 L 18	Cystitis	-
Gina	7	wk	R 19 L 16	Atopie	Cefaseptin
Jeddusch	3	m	R 21 L 18	Kontrolle	-
Jenny	12	w	R 17 L 17	OP	-
Jonny	3	m	R 18 L 24	Herzuntersuchung	-
Julchen	13	wk	R 24 L 19	Kontrolle	Metamizol
Kira	4	w	R 25 L 25	Otitis	-
Lisa	10	w	R 16 L 25	OP	-
Lukas	10	m	R 18 L 22	Begleithund	-
Max	12	m	R 21 L 21	Impfung	-
Moritz	14	m	R 20 L 19	Kontrolle	Karsivan
Paula	8	w	R 18 L 21	Kontrolle	-
Purzel	9	m	R 26 L 29	Otitis	Marbofloxacin
Yucca	1	w	R 18 L 20	Kontrolle	Furosemid
Sam	3	mk	R 22 L 18	OP	Meloxicam
Skippi	11	wk	R 19 L 21	Kontrolle	Metronidazol

Fortsetzung Tab. 1.1

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis	Grund der Vorstellung	Medikamente
Tommy	13	m	R 16 L 16	Durchfall	Amoxicillin
Woody	15	m	R 18 L 15	Kontrolle	Meloxicam
Yogi	1	m	R 23 L 22	Züchterin	-
Xena	2	w	R 21 L 20	Züchterin	-

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

1.2 Staffordshire Terrier

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Momo	4	w	R 28 L 25	Tierheim	-
Ates	9	mk	R 25 L 33	Tierheim	-
Balu	9	mk	R 36 L 36	Tierheim	-
Bärchen	10	mk	R 25 L 28	Tierheim	-
Bella	8	wk	R 23 L 22	Tierheim	-
Bommel	10	mk	R 21 L 20	Tierheim	-
Charly	10	mk	R 21 L 23	Tierheim	-
Danny	4	mk	R 21 L 24	Tierheim	-
Henna	6	wk	R 26 L 20	Tierheim	-
Josi	8	w	R 23 L 21	Tierheim	-
Lore	8	wk	R 21 L 21	Tierheim	-
Martina	8	wk	R 28 L 35	Tierheim	-
Sugar	4	wk	R 21 L 22	Tierheim	-
Tombola	8	wk	R 35 L 35	Tierheim	-

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

1.3 Deutsche Schäferhunde

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Bine	1	w	R 23 L 19	OP	-
Carlos	9	m	R 30 L 37	OP	-
Jill	7	wk	R 30 L 25	OP	Phenylbutazon
Ken	1	m	R 26 L 26	Ankauf	-
Layla	9	wk	R 18 L 23	Kontrolle	Amoxicillin, Metamizol
Max	6	mk	R 20 L 25	OP	Amoxicillin
Saro	1	m	R 26 L 24	Ankauf	-

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute, OP= Operation

1.4 Mischlinge

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Ben	8	mk	R 24 L 21	Fraktur	-
Berry	14	mk	R 18 L 18	Vorlesung	-
Blondi	11	mk	R 26 L 24	Nierenkontrolle	Amoxicillin
Caramba	1	w	R 31 L 30	Lahmheit	Amoxicillin
Daysi	5	w	R 20 L 18	Magenproblem	Metronidazol
Eddie	7	mk	R 22 L 31	Vorlesung	-
Emilie	4	wk	R 19 L 22	Vorlesung	-
Filou	3	m	R 20 L 20	Vorlesung	-
Hunter	3	m	R 24 L 35	Tierheim	-
Janine	3	wk	R 27 L 27	Osteotomie	-
Jimmy	5	mk	R 19 L 19	Kreuzbandriß	-
Kaya	4	wk	R 33 L 27	Vorlesung	-

Fortsetzung Tab. 1.4

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Leo	6	m	R 21 L 23	Vorlesung	-
MaryJane	10	wk	R 23 L 23	Lahmheit	Phenylbutazon
Mausi	3	wk	R 22 L 19	Vorlesung	-
Mitra	8	wk	R 30 L 29	Vorlesung	-
Odin	9	m	R 24 L 21	Blutspende	-
Oskar	7	mk	R 23 L 20	Kreuzbandriß	-
Sally	2	wk	R 20 L 20	Lahmheit	-
Schnecke	10	wk	R 23 L 22	Vorlesung	-
Shila	12	wk	R 20 L 22	Vorlesung	-
Terry	10	mk	R 21 L 21	Tierheim	-

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

1.5 Labrador

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Atlanta	3	w	R 22 L 24	Begleithund	-
Aron	1	m	R 20 L 20	OP	Metamizol
Choko	4	mk	R 20 L 21	Lahmheit	Meloxicam
Moritz	10	mk	R 18 L 19	Blutspender	-
Ronja	4	wk	R 20 L 20	Blutspender	-

Abk.: m=männlich, mk=männlich-kastriert, w=weiblich, wk=weiblich-kastriert, STT=Schirmer-Tränen-Test, R=rechtes Auge, L=linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute, OP=Operation

1.6 Hunde anderer Rassen

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Aica	6	w	R 20 L 20	Lahmheit	Amoxicillin
Amy	8	w	R 22 L 22	Impfung	-
Arco	4	m	R 21 L 22	Blutspender	-
Bailey	2	m	R 26 L 24	Blutspender	-
Betty	1	w	R 23 L 21	Lahmheit	-
Bobby	12	m	R 23 L 27	Lahmheit	-
Bruno	7	m	R 21 L 21	Milbenbefall	Cefaseptin
Carlos	2	m	R 30 L 38	OP	Amoxicillin
Casper	10	m	R 22 L 29	Lahmheit	-
Celly	2	w	R 20 L 18	Blutspende	-
Christien	7	m	R 19 L 19	OP	-
Conner	5	m	R 22 L 22	Kontrolle	Enrofloxacin
Cookie	1	w	R 18 L 18	OP	-
Dasko	5	m	R 30 L 30	Impfung	-
Dino	11	m	R 19 L 19	Kontrolle	Vasotop
Emma	1	w	R 23 L 23	Kreuzbandriß	-
Farina	10	wk	R 20 L 20	Vorlesung	-
Freya	10	w	R 19 L 22	Blutspende	-
Funki	12	wk	R 20 L 20	Kontrolle	Enrofloxacin
Grace	2	wk	R 27 L 22	Kontrolle	Amoxicillin
Gina	11	w	R 20 L 23	OP	-
Jessie	5	w	R 24 L 28	Rhinoskopie	-
Joschi	2	m	R 25 L 25	Vorlesung	-
Kissa	8	wk	R 20 L 19	Arthroskopie	-
Lisa	8	w	R 25 L 25	Impfung	-

Fortsetzung Tab. 1.6.

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Grund der Vorstellung	Medikamente
Lotte	8	wk	R 34 L 25	Vorlesung	-
Luna	3	wk	R 23 L 25	Impfung	-
Mia	3	wk	R 20 L 25	Vorlesung	-
Miss Marple	6	wk	R 20 L 19	Zahnkontrolle	-
Oskar	4	m	R 21 L 23	OP	Cefaseptin
Othello	8	m	R 18 L 24	Othämatom	-
Pia	2	w	R 25 L 22	Vorlesung	-
Putzelchen	7	m	R 18 L 21	Kontrolle	-
Raika	12	wk	R 29 L 20	Impfung	-
Sam	1	mk	R 27 L 20	Kontrolle	-
Sarah	12	wk	R 24 L 24	OP	-
Tanja	5	wk	R 23 L 25	OP	-
Taz	10	wk	R 25 L 35	OP	-
Tanja	8	wk	R 18 L 18	OP	-
Tequila	11	m	R 20 L 20	Otoskopie	Marbofloxacin
Willi	6	m	R 20 L 18	OP	Amoxicillin

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute, OP= Operation

2- WHWT, an KCS erkrankt, unbehandelt

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Medikamente
Evita	7	wk	R 10 L 11	Tränenersatz
Mäxchen	14	mk	R 11 L 9	Tränenersatz
Sparky	14	mk	R 9 L 10	Tränenersatz

Abk.: m=männlich, mk=männlich-kastriert, w=weiblich, wk=weiblich-kastriert, STT=Schirmer-Tränen-Test, R=rechtes Auge, L=linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

3-WHWT, an KCS erkrankt, behandelt

3.1 mit Optimune (0,2%ige Cyclosporin A Augensalbe)

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Medikamente
Benni	5	mk	R 12 L 7	+ Tränenersatz
Bella	12	wk	R 13 L 5	+ Tränenersatz
Cindy	8	w	R 3 L 3	+ Tränenersatz
Fränzis	7	w	R 6 L 6	+ Tränenersatz
Winni	11	m	R 15 L 18	+ Tränenersatz

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

3.2 mit Tacrolimus

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Medikamente
Ben	6	m	R 3 L 10	+ Tränenersatz

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

3.3 mit 2%igen Cyclosporin A Augentropfen

Name	Alter (Jahre)	Geschlecht	STT Ergebnis mm/Min	Medikamente
Bonny	6	W	R 10 L 15	+ Tränenersatz
Harry	11	M	R 25 L 22	+ Tränenersatz
Lisa	14	Wk	R 10 L 15	+ Tränenersatz

Abk.: m= männlich, mk= männlich-kastriert, w= weiblich, wk= weiblich-kastriert, STT= Schirmer-Tränen-Test, R= rechtes Auge, L= linkes Auge, mm/Min= Millimeter/Minute

Publikationsverzeichnis:

Vorträge:

Jurk, S.; Kindler, S.; Eule, C.; Grus, F.:
Detection of Tear Protein Pattern via SELDI Protein Chips (surface enhanced laser desorption ionisation) in the West Highland White Terrier (WHWT). A Preliminary Report.
ECVO-Meeting, 15.-18.05.2008, Versailles France

Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.; Eule, C.:
Tränenproteinprofile bei augengesunden und an Keratokonjunktivitis sicca (KCS) erkrankten Hunden gemessen mittels MALDI-TOF.
17. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG,
31.1./1.2.2009, Berlin.

Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.; Eule, C.:
Detection of tear film protein pattern in normal and dogs suffering from keratoconjunctivitis sicca (KCS) via MALDI-TOF.
ECVO-ESVO-DSVO-Meeting, 03.-07.06.2009, Copenhagen Denmark.

Poster:

Eule, C.; Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.:
Tear Protein Pattern detected via MALDI-TOF in healthy dogs and in dogs with keratoconjunctivitis sicca (KCS).
ARVO Annual-Meeting, 03.-07.05.2009, Fort Lauderdale, Florida USA.

Proceedings der Vorträge und Poster

Eule, C.; Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.:
Tear Protein Pattern detected via MALDI-TOF in Healthy Dogs and in Dogs with Keratoconjunctivitis Sicca (KCS).
Invest Ophthalmol Vis Sci 2009, 50: ARVO E-Abstract 2607.

Jurk, S.; Kindler, S.; Eule, C.; Grus, F.:
Detection of Tear Protein Pattern via SELDI Protein Chips (surface enhanced laser desorption ionisation) in the West Highland White Terrier (WHWT). A Preliminary Report.
Abstracts: Meeting of the ECVO/ESVO, Versailles, France 14–18 May 2008.
Veterinary Ophthalmology 2009; 12(1), 61-70.

Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.; Eule, C.:
Tränenproteinprofile bei augengesunden und an Keratokonjunktivitis sicca (KCS) erkrankten Hunden gemessen mittels MALDI-TOF.
17. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG,
31.1./1.2.2009, Berlin .
Tierärztliche Praxis Kleintiere 2009; 37, A11.

Jurk, S.; Böhm, N.; Grus, F.; Eule, C.:

Detection of tear film protein pattern in normal and dogs suffering from keratokonjunktivitis sicca (KCS) via MALDI-TOF.

Abstracts: Meeting of the ECVO/ESVO, Copenhagen, Denmark, 3-6 June 2009.

Veterinary Ophthalmology 2009; 12(6), 379-385

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Dr. Franz Grus für die Möglichkeit der Anfertigung der Doktorarbeit in der experimentellen Ophthalmologie der Universitätsklinik Mainz danken. Frau Prof. Dr. Corinna Eule danke ich sehr, sehr für die Unterstützung und Betreuung der extern durchgeführten Arbeit.

Dr. Stefan Kindler, Wiesbaden danke ich für die Hilfe bei der Sammlung der Proben am Anfang der Arbeit, was auch den Anstoß für diese Doktorarbeit gab. Ich danke sehr der Praxis Dr. Fengler und Dr. Emmelmann, Berlin, da sie mir halfen Proben von erkrankten und behandelten West Highland White Terrier zu sammeln. Dem Tierheim Berlin bin ich zu Dank verpflichtet, da mir dort völlig unkompliziert zahlreiche Hunde für einen Schirmer-Tränen-Test zur Verfügung gestellt wurden und so meine gesunde Kontrollgruppe deutlich an Probanden zunahm. Auch der Züchterin Frau Gierschner, Berlin die mir ihre Westies zur Verfügung stellte danke ich sehr herzlich.

Sabine, Nina und Nelly- ohne euch wäre ich im Labor mit den zahlreichen Chemikalien, Ansätzen, Geräten und Programmen völlig untergegangen!

Dominik, ohne den mich die Auswertung wohl in die Knie gezwungen hätte. Danke auch für den Telefon-Support !! Ralf- der es mir ermöglichte von Berlin aus meine Daten in Mainz zu bearbeiten und auch von Mainz aus meinen Computer in Berlin wieder zu Auswertungen überredete-Dankeschön!

Nils bin ich für die Beantwortung aller Fragen und Hilfe bei der Auswertung der gesammelten Daten dankbar. Xenia danke ich für ihr offenes Ohr bei den Schwierigkeiten mit den LIFT-Spektren und der Datenbanksuche.

Der Gesellschaft für kynologische Forschung, Bonn gilt großer Dank für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung und der Ermöglichung dieses Studiums und besonders meiner Mutter für ihre fortwährende wertvolle Unterstützung geistiger und materieller Art. Ich wünschte mein Vater hätte dabei sein können.

Und ganz besonders danken möchte ich Simon, der mit mir nach Berlin gezogen ist und mich immer in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 20.12.2010

Sandra Jurk