

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinikdirektor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Geerling

**Vergleichende Evaluation der Entzündungsprozesse nach Schädigung der
Tränendrüse in zwei in vivo Mausmodellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von:
Carlo Schlegel

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Stefan Schrader

Zweitgutachterin: Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall

Auflistung eigener Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden von mir als Ko-Autor veröffentlicht:

Jana Dietrich, Carlo Schlegel, Mathias Roth, Joana Witt, Gerd Geerling, Sonja Mertsch, Stefan Schrader, (2018), *Comparative analysis on the dynamic of lacrimal gland damage and regeneration after Interleukin-1 α or duct ligation induced dry eye disease in mice*, *Experimental Eye Research* 172 66–77 C¹.

Zur Erhebung der Daten wurde die HE-Färbung sowohl von der Erstautorin der Publikation, Frau Doktor Jana Dietrich, als auch von mir je einmal ausgewertet. Die Ergebnisse wurden anschließend zusammengeführt. Die Fluoreszeinfärbung sowie die immunhistologische Untersuchung von CD3, CD68 und CD138 wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Arbeit zu finden. Mein Anteil an der Publikation mit Frau Dietrich beträgt 18 %¹.

Zusammenfassung

Das schwere Trockene Auge (engl. *dry eye disease*; DED) ist eine häufige Erkrankung, welche unter anderem durch eine primäre oder sekundäre Tränendrüseninsuffizienz hervorgerufen wird. Therapieansätze sind bis auf wenige Ausnahmen rein symptomatisch, so dass die Entwicklung neuer kausaler Therapieansätze klinisch wünschenswert und erforderlich ist. Aus experimentellen Studien gibt es erste Hinweise, dass geschädigte Drüsen ein Regenerationspotential besitzen. Um dies weitergehend zu untersuchen, benötigt man entsprechend geeignete Tiermodelle. Diese sollten die zugrundeliegende Schädigung der Tränendrüse beim DED widerspiegeln und eine entsprechende Manifestation der wichtigsten klinischen Symptome aufweisen. Ziel dieser Arbeit war es, zwei unterschiedliche Mausmodelle nach Schädigung der Tränendrüse hinsichtlich der Tränensekretion, kornealer Epithelschäden, Entzündungsreaktion in der Tränendrüse, sowie der Regenerationsprozesse zu evaluieren. Die dafür genutzten Schädigungsmodelle waren zum einen die Ligatur des *Ductus lacrimalis* (DL) und zum anderen eine einmalige Injektion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 α (IL-1 α) in die Tränendrüse. In beiden Gruppen wurde die Dynamik der Schädigungsreaktion an fünf Zeitpunkten nach induzierter Schädigung untersucht. Die Qualität und Quantität der Schädigung wurde anhand der Schwere der hervorgerufenen Entzündungsreaktion, der Schädigung des Gewebes und anhand von klinischen Parametern der Augenoberfläche eruiert. Es zeigte sich, dass IL-1 α einen Tag nach Injektion eine Entzündung hervorruft, welche sich bis Tag 7 vollständig zurückbildet. Die DL führt ab Tag 3 zu einer Entzündungsreaktion, welche 21 Tage nach Wiedereröffnung der DL nachließ. Die Schädigung durch IL-1 α Injektion spiegelt eher eine akute Entzündung mit einer moderaten und passageren Schädigung des Gewebes wider. Hingegen entspricht die Schädigung durch die DL eher dem Bild einer schweren chronischen Entzündung der TD, was eher dem Verlauf des schweren Trockenen Auges entspricht. Daher erscheint die IL-1 Injektion eher geeignet für die Erforschung akuter Entzündungen, wohingegen sich die DL eher als Schädigungsmodell zur Erforschung regenerativer Therapieansätze beim schweren Trockenen Auge anbietet.

Conclusion

The dry eye disease (DED) is a common medical condition, which can be caused by both primary and secondary lacrimal gland (LG) insufficiency. With few exceptions, therapeutic approaches are solely symptomatic. Therefore, the development of new causal therapeutic approaches is desired and needed for treatment. Experimental studies were able to show that impaired lacrimal glands have the potential to regenerate. To further examine this, suitable animal models are needed. These should reflect the damage of the LG damage due to DED and present its most important clinical symptoms. Aim of this work was therefore to evaluate ocular surface changes, inflammation as well as regenerative processes in two different mouse models with damage of the LG.

The used damage models were the ligation of the *Ductus lacrimalis (DL)* and a single injection with the pro-inflammatory Cytokine IL-1 α into the lacrimal gland. In both groups the dynamic of the damage was observed at five specific timepoints after the induced damage. The quality and quantity of the LG damage was determined on the basis of the inflammatory reaction and on the damage of the tissue, as well as on the basis of clinical ocular surface parameters. It was demonstrated that IL-1 α causes an inflammatory reaction on day 1 after injection, which decreases completely until day 7. The DL caused an inflammatory reaction beginning at day 3, which declined 21 days after opening the DL. The injection with IL-1 α represents rather an acute inflammation with a moderate and transient damage of the tissue. Meanwhile, the damage caused by the DL seems to mimic more closely the appearance of a chronic inflammatory reaction of the lacrimal gland, which is closer to the processes observed in severe DED. Therefore, the IL-1 α injection might be more suitable to examine acute inflammation of the lacrimal gland while the DL might be more appropriate to examine more chronic conditions such as severe DED.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ADDE	<i>Aqueous tear-deficient dry eye</i>
DAB	Diaminobenzidin
DED	<i>Dry Eye Disease</i>
DES	<i>Dry Eye Syndrome</i>
DL	Ductus Ligatur
EDE	<i>Evaporative dry Eye</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	<i>Equine Serum</i>
EtOH	Ethanol
EV	Extrazelluläre Vesikel
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FL	Fluoreszeinfärbung
GP	<i>Glandula Parotis</i>
GS	<i>Glandula Submandibularis</i>
h	Stunde
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HPF	<i>High Power Field</i> (Gesichtsfeld)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
M.	Musculus
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

N.	<i>Nervus</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunde
TD	Tränendrüse
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TSG6	<i>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
z.B.	zum Beispiel
Z/mm ²	Zellen pro Quadratmillimeter
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
μ m	Mikrometer
μ L	Mikroliter
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Conclusion	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Tränendrüse	1
1.1.1 Morphologie	1
1.1.2 Zelltypen	2
1.1.3 Tränenflüssigkeit	4
1.2 Erkrankungen der Tränendrüse	5
1.2.1 Trockenes Auge	5
1.2.2 Beteiligung des Immunsystems	7
1.2.3 Therapie des Trockenen Auges	9
1.2.4 Experimentelle Therapieansätze	10
1.3 Mausmodelle des Trockenen Auges	12
1.3.1 Ductus Ligatur	13
1.3.2 IL-1 α -Injektion	13
1.3.3 Bedeutung der IL-1 α -Injektion und DL als Schädigungsmodelle	14
1.4 Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Materialliste	16
2.2 Versuchsvorbereitung	18
2.2.1 Versuchstiere	18
2.2.2 Gruppeneinteilung	18
2.3 Operation	20
2.3.1 Narkose	20
2.3.2 Allgemeiner Operationsteil	20
2.3.3 Postoperative Versorgung	22
2.3.4 Klinische Parameter	22
2.4 Histologische Aufarbeitung	23
2.4.1 Entnahme der Tränendrüse	23
2.4.2 Einbetten	23
2.4.3 Schneiden	24
2.4.4 Hämatoxylin und Eosin Färbung	24
2.3.5 Hämatoxylin und Eosin Auswertung	24
2.4.6 Immunhistologische Färbungen mit DAB	25
2.4.7 Auswertung Immunhistologische Färbung	27
2.5 Statistik	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Klinische Parameter	28
3.1.1 <i>Oxford Grading</i> der Fluoreszin-Färbung	28
3.1.2 Schirmer Test	28
3.2 Histologische Auswertung der Tränendrüsen Schädigung	29
3.2.1 Kontrolle	29
3.2.2 Ductus Ligatur gegenüber der Sham Operation	29
3.2.3 IL-1 α gegenüber NaCl Injektion	31
3.2.4 Veränderungen in der Fläche des Gesamtdrüsen Gewebes	33

3.2.5 Veränderungen des Anteils von Azinuszellen an der Gesamtfläche	35
3.2.6 Infiltration von Immunzellen	37
3.3 Immunhistologie Auswertung	38
3.3.1 CD3 (T-Zellen)	38
3.3.2 CD68 (Makrophagen)	41
3.3.3 CD138 (Plasmazellen)	44
4. Diskussion	48
4.1 Interleukin-1 α -Injektion	49
4.2 Ductus Ligatur	52
4.3 Vergleich der Entzündungsreaktion beider Modelle	56
4.4 Schirmer Test	58
5. Ausblick	60
Literatur- und Quellenverzeichnis	61
Danksagung	1

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: ANATOMIE DER TRÄNENDRÜSE ²	1
ABB. 2: HISTOLOGIE DES MURINEN TRÄNENDRÜSEN-PARENCHYMS.....	2
ABB. 3: DARSTELLUNG DES AUFBAUS DER VERSUCHSGRUPPEN.....	19
ABB. 4: OPERATIONS- GEBIET.....	20
ABB. 5: SILIKONSCHLAUCH MIT DUCTUS LACRIMALIS.....	21
ABB. 6: BEISPIEL EINER INTAKTEN EPITHELZELLSCHICHT BEI DER MURINEN KORNEA NACH APPLIZIERUNG VON FLUORESZEIN UNTER DER BLAULICHTQUELLE.....	23
ABB. 7: BEISPIELBILDER (IN 10X VERGRÖßERUNG) DES SCORES FÜR DIE BEWERTUNG DER IMMUNZELLINFILTRATION.....	25
ABB. 8: ANSTIEG DER FL IN ALLEN GRUPPEN POSTOPERATIV.....	28
ABB. 9: NATIVE TD (KONTROLLE) IN 20X VERGRÖßERUNG.....	29
ABB. 10: VERGLEICH ZWISCHEN DER DL UND DER SHAM OPERATION AN DEN VERSCHIEDENEN TAGEN.....	31
ABB. 11: VERGLEICH ZWISCHEN DER INJEKTION VON IL-1A UND NACL.....	33
ABB. 12: BERECHNUNG DER PARENCHYMALEN ZELLFLÄCHE (%) DER TD.....	34
ABB. 13: VERGLEICH VON SCHÄDIGUNG UND REGENERATION DER GESAMTEN PARENCHYMFLÄCHE NACH IL-1 α -INJEKTION UND DL.....	35
ABB. 14: BERECHNUNG DER VITALEN AZINUZELLEN (%) DER TD.....	36
ABB. 15: VERGLEICH VON SCHÄDIGUNG UND REGENERATION DER FLÄCHE VITALER AZINUSZELLEN NACH IL- α INJEKTION UND DL.....	36
ABB. 16: HE FÄRBUNG DER TD AN TAG 7 NACH DL IN 10X VERGRÖßERUNG.....	37
ABB. 17: VERGLEICH DER IMMUNZELLINFILTRATION ZWISCHEN DER DL UND DER SHAM OPERATION.....	38
ABB. 18: BEISPIELBILD EINER IMMUNHISTOLOGISCHEN FÄRBUNG VON CD3 POSITIVEN ZELLEN IN 20X VERGRÖßERUNG.....	39
ABB. 19: CD3 FÄRBUNG DER TD.....	40
ABB. 20: ANZAHL CD3 POSITIVER ZELLEN PRO MM ²	41
ABB. 21: BEISPIELBILD DER IMMUNHISTOLOGISCHEN FÄRBUNG EINER TD. AN TAG 3 NACH DL IN 10X VERGRÖßERUNG.....	42
ABB. 22: CD68 FÄRBUNG DER TD.....	43
ABB. 23: ANZAHL CD68 POSITIVER ZELLEN PRO MM ²	44
ABB. 24: BEISPIELBILD DER IMMUNHISTOLOGISCHEN FÄRBUNG EINER TD. AN TAG 7 NACH DL IN 10X VERGRÖßERUNG.....	45
ABB. 25: CD138 FÄRBUNG DER TD.....	46
ABB. 26: ANZAHL CD138 POSITIVER ZELLEN PRO MM ²	47

1. Einleitung

1.1 Tränendrüse

1.1.1 Morphologie

Die Tränendrüse (TD) ist beim Menschen beidseits lateral in der *Fossa glandulae lacrimalis* des *Os frontalis* über dem Augapfel gelegen (Abb. 1) und hat ein Volumen von etwa 1.2 cm³. Die Drüse besteht aus einem intraorbitalen *Pars orbitalis* und einem kleineren, durch die Sehne des *M. levator palpebrae superioris* abgetrennten, *Pars palpebralis*. Ihre 6-12 Drüsenausführungsgänge (*Ductuli excretorii*) sind kurz und eröffnen sich an der oberen-seitlichen Fornix direkt auf die Augenoberfläche². Zusätzlich befinden sich akzessorische TD, sogenannte Krause- und Wolfring-Drüsen, im oberen und unteren Fornix der Konjunktiva. Im Gegensatz zur humanen TD umfasst der murine Tränenapparat beidseits zwei TD, bestehend aus einer kleineren intraorbitalen TD und einer extraorbitalen Haupttränendrüse³. Die intraorbitale Drüse befindet sich seitlich hinter dem Oberlid, wohingegen die extraorbitale TD sich direkt ventral-kaudal des Ohrknorpels befindet. Vom ventralen, superioren Rand der extraorbitalen Haupttränendrüse zieht dessen Tränenausführungsgang über den *M. masseter* und mündet in der Außenseite des Oberlids³. Das Tränensekret der intraorbitalen TD wird über einen eigenen kurzen Gang dem Tränenausführungsgang der extraorbitalen Drüse zugeführt.

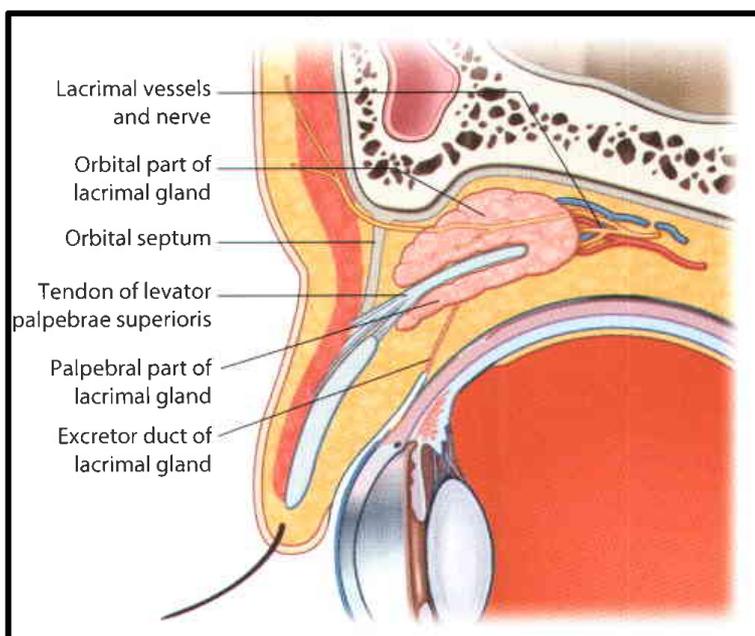


Abb. 1: Anatomie der menschlichen Tränendrüse, aus Gray's Atlas of Anatomie 1. Auflage (das Urheberrecht ist erloschen)⁴.

1.1.2 Zelltypen

Histologisch ist das tubulo-alveoläre Parenchym der TD durch Bindegewebssepten geteilt. Das Parenchym selbst besteht aus Azinus-, Ductus- und Myoepithel-Zellen (siehe Abb. 2). Die Azinuszellen bilden mit 80 % den Großteil der Zellen des Parenchyms und stellen pyramidale, polarisierte Zellen dar, welche sich zu Azini zusammenlagern und ein zentrales Lumen bilden⁵. Über die Membran der Azinuszellen werden zusammen mit Wasser und Elektrolyten auch Proteine ins zentrale Lumen sezerniert. Zuvor werden die sekretorischen Proteine in Granula oder Vesikeln an der apikalen Membran gespeichert. Die basale Membran der Azinuszellen ist in Richtung des Interstitiums gerichtet. Auf dieser interstitiellen Seite der Zellen finden sich der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum. An der gegenüber liegenden Seite grenzt die Azinuszelle an das zentrale Lumen, dort verbinden sich die Azinuszellen zum Ausführungsgang.

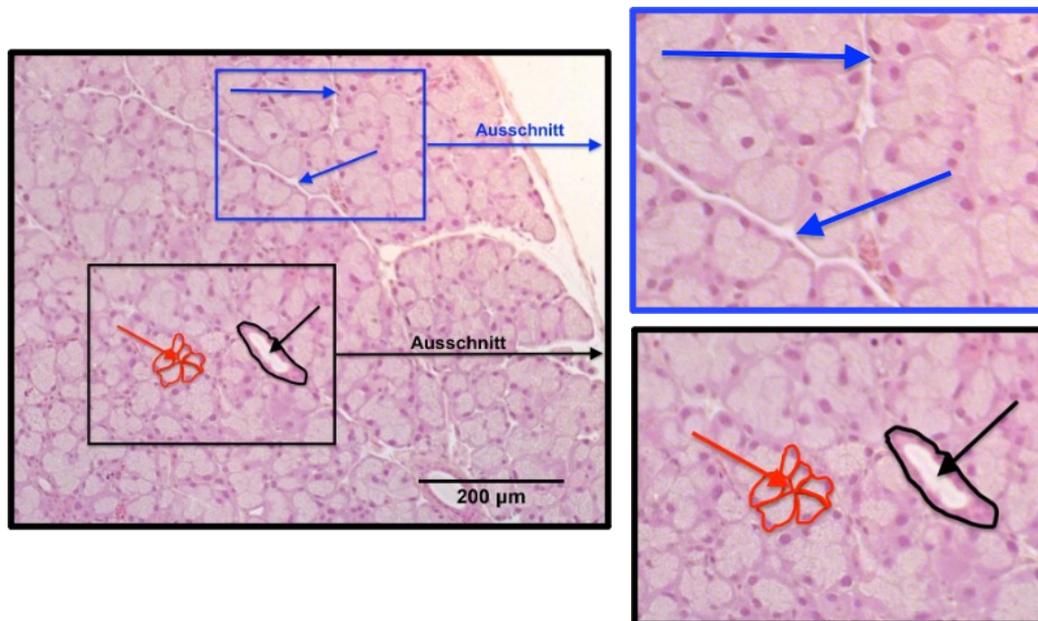


Abb. 2: Histologie des murinen Tränendrüsenparenchyms in einer nativen Drüse, die Bindegewebssepten sind mit blauen Pfeilen markiert, vergrößerter Ausschnitt in blauem Kästchen. Rot umzeichnet sind die Azinuszellen mit zentralem Lumen (roter Pfeil). Die Ausführungsgänge sind schwarz umzeichnet und ihr Lumen mit einem schwarzen Pfeil markiert, vergrößerter Ausschnitt in schwarzem Kästchen.

Im Parenchym der TD finden sich auch mesenchymale Stammzellen (MSC). Diese können durch Gewebeschäden aktiviert werden und mutmaßlich zur Regeneration der TD beitragen⁶. Nach der Sekretion durch Azinuszellen ins Lumen, wird die primäre Tränendrüsenflüssigkeit durch die Ductuszellen weiter mittels Elektrolyten und Wasser modifiziert und auf die Augenoberfläche geleitet. Die den Ductus in zirkulärer Anordnung umgebenden myoepithelialen Zellen sind wichtig für die Erhaltung der Drüsenstruktur. Sie umgeben mit ihren sternförmigen Ausläufern die basale Seite der

Azinus- und Ductuszellen und sind neben ihrer strukturellen Funktion zusätzlich durch Kontraktion an der Direktion der Tränenflüssigkeit auf die Augenoberfläche beteiligt². Im Bindegewebe um die Azinuszellen befinden sich Teile des „*mucosal-associated lymphoid tissue*“ welches Plasmazellen, T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen enthält. Hierbei bilden die Plasmazellen durch das Sezernieren von IgA einen wichtigen Bestandteil der Tränenflüssigkeit zum Schutz des Auges vor Pathogenen.

Die neuronale Innervation der TD und Becherzellen reguliert die Sekretion der Muzine, Proteine und der Tränendrüsenflüssigkeit. Durch die neuronale Innervation werden die Zusammensetzung und Quantität der Tränenflüssigkeit je nach Situation adaptiert. Hierfür ist die TD efferent parasympathisch, efferent sympathisch und afferent sensorisch innerviert⁵. Die parasympathischen Nerven enthalten den Neurotransmitter Acetylcholin (Ach) und das *vasoactive intestinal peptide* (VIP). Die sympathischen Nerven enthalten Norepinephrin, während sich in den sensorischen Nerven Substanz P und Galanin finden. Die Stimulation der TD erfolgt sensibel über den *N. lacrimalis*, parasympathisch über den *N. intermedius* und sympathisch aus dem *Ganglion cervicale superius*⁷. Da die sensorischen Signale über den *Nucleus lacrimalis* umgeschaltet werden, handelt es sich nicht um einen einfachen monosynaptischen Reflexbogen, sondern um einen polysynaptischen Reflexbogen⁷.

Durch die sympathischen Nerven werden Blutgefäße innerviert, zusätzlich versorgen die Nerven sekretorische und myoepitheliale Zellen. Wichtige Steuerfunktionen sowie die Elektrolyt-, Wasser und Proteinsekretion der TD werden von parasympathischen Nerven übernommen. Die parasympathische Stimulation kann durch die Intensität der sensorischen Signale an die Situation angepasst werden. Hierzu finden sich auf der basalen Membran der Azinuszellen die parasympathischen M₃ und die VIP Rezeptoren, welche durch cholinerge Agonisten aktiviert werden. An ihren apikalen Seiten sind die Azinuszellen durch *gap junctions* miteinander verbunden, welche eine synchronisierte Polarisierung der Azinuszellen ermöglichen. Die Lumina verschiedener Azini bilden den Ausführungsgang, der von kubischen Epithelzellen des Ductus umgeben wird. Diese Ductuszellen machen ca. 10 – 12 % der Drüse aus⁵.

Die hormonelle Regulation erfolgt hauptsächlich durch Androgene wie Testosteron. Durch deren Bindung an Rezeptoren der Konjunktiva und TD wird die Ausschüttung von IgA reguliert⁸. Die Hormone sind zudem für die histologischen Geschlechtsunterschiede, beispielsweise kleinerer Azinuszellen in der weiblichen TD, verantwortlich⁹. Zudem sind Androgene in pathologischen Situationen wichtig, da sie über eine

Entzündungshemmung zu einer Verbesserung der Organfunktion der TD beitragen^{8,9}. Durch diese Eigenschaft sind die Androgene besonders in der geschädigten TD von hoher Relevanz. Gesteuert wird die Hormonausschüttung über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, ein Fehlen der Hypophyse oder Entfernen der anterioren Hirnanhangsdrüse führt zu einer Atrophie der TD¹⁰.

1.1.3 Tränenflüssigkeit

Der Tränenfilm ist eine komplexe Flüssigkeit und setzt sich aus drei unterschiedlichen Schichten zusammen:

1. Nach außen hin wird der Tränenfilm von der Lipidschicht abgegrenzt. Diese Schicht wird von den Meibomdrüsen produziert und weist eine Dicke von ca. 0,1 μm auf. Sie verzögert die Evaporation und dient u.a. zur Stabilisierung des Tränenfilms. Zusätzlich bieten die Eigenschaften der Lipidschicht die Möglichkeit der gleichmäßigen Verteilung des Tränenfilms auf der Augenoberfläche. Diese Schicht besteht hauptsächlich aus Cholesterin, Cholesterinestern, Triglyceriden und Phospholipiden, welche zusammen 60 – 70 % der Lipidschicht ausmachen¹¹.
2. Die mittlere Schicht ist eine mukös-wässrige Schicht und weist einen absteigenden Muzingradienten zur Lipidschicht auf. Ihre Funktion ist die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Kornea und Konjunktiva sowie Schutz vor Pathogenen. Sie setzt sich vor allem aus Wasser, Proteinen und gelösten Muzinen sowie Immunglobulin A (IgA), Lysozym und Laktoferrin zusammen. Zusätzlich befinden sich durch die TD produzierte Wachstumsfaktoren wie *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) in der wässrigen Phase des Tränenfilms. Der wässrige Anteil ist circa 6 – 10 μm dick. Dieser wird zu 95 % von der TD produziert und zu 5 % von den akzessorischen Krause- und Wolfring-Drüsen in den Übergangsfalten der Augenlider.
3. Der muköse Anteil ist ca. 0,02 bis 0,05 μm dick, er wird durch die Becherzellen der Konjunktiva sowie den Epithelzellen von Kornea und Sklera sezerniert und bildet die innerste Komponente. Er besteht aus den Muzinen 1, 4 und 5AC welche von innen nach außen hydrophiler werden und schließlich in die wässrige Phase übergehen. Die Muzinschicht macht die hydrophobe Oberfläche der Kornea hydrophiler und somit besser benetzbar. Weiterhin sorgt das membranständige

Mucin1 durch seine Größe und durch die negative Ladung dafür, dass keine anderen Zellen oder Mikroorganismen sich an die Epithelzellen anhaften können.

In der Gesamtheit dient der Tränenfilm dem Schutz der Augenoberfläche, vor allem vor Pathogenen und dem Austrocknen, zudem leistet er einen wichtigen Beitrag für die Sehfunktion. Um diese Funktion bestmöglich erfüllen zu können, wird die Sekretion neuronal und hormonell situationsbedingt reguliert^{5,9}. Eine gesunde TD produziert in etwa 2 µl Tränenflüssigkeit pro min, deren Verteilung durch Blinzeln erfolgt¹². Damit die effektive Verteilung gewährleistet ist, sind ein normaler Lidschlußreflex, guter Kontakt zwischen Augapfel und Lid, sowie ein gesundes Hornhautepithel entscheidend.

1.2 Erkrankungen der Tränendrüse

Häufige Erkrankungen der TD sind akute oder chronische Entzündungen. Die Pathogenese der entzündlichen Reaktionen reicht von lokalen Infektionen über systemische Infektionen bis hin zu systemischen Erkrankungen nicht infektiöser Genese. Hierbei sind rheumatische Erkrankungen oder *Graft-versus-Host*-Reaktionen die häufigsten Ursachen, die zur Schädigung der TD führen. Länger andauernde Schädigungen resultieren häufig in einem chronischen Mangel an Tränenflüssigkeit. Zusätzlich kann ein Mangel an Tränenflüssigkeit auch durch raumfordernde Erkrankungen, wie meist benigne TD-Tumoren (z.B. pleomorphe Adenome) ausgelöst werden.

1.2.1 Trockenes Auge

Beim Trockenen Auge (Keratoconjunktivitis sicca) handelt sich per Definition um „eine multifaktorielle Erkrankung der Tränen und Augenoberfläche, charakterisiert durch einen Verlust der Homöostase des Tränenfilms. Sie wird begleitet von okulären Symptomen, hierbei spielen eine Instabilität des Tränenfilms und Hyperosmolarität, Entzündungen und Schädigung der Augenoberfläche sowie neurologische Veränderungen eine Rolle in der Ätiologie“¹³. Die Entstehungsmechanismen des Trockenen Auges können in eine evaporative und eine hypovoläme Form eingeteilt werden¹⁴. Zudem können neurologische Ursachen, Hormone und Umweltfaktoren die Erkrankung zusätzlich beeinflussen⁷.

Entzündungen als Ursache eines DED spielen eine wichtige Rolle, da sie sowohl für einen quantitativen als auch einen qualitativen Tränenmangel verantwortlich sein können.

Zudem ist es vor allem die Entzündung, welche nach der Entstehung des Trockenen Auges für eine Schädigung der Augenoberfläche sorgt, sowohl als Ursache wie auch als Folge des Zellschadens¹⁵.

Die Prävalenz der Erkrankung des Trockenen Auges steigt mit zunehmendem Lebensalter und ist bei Frauen häufiger als bei Männern. Zudem besteht ein Unterschied zwischen Ethnien, so dass die Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung niedriger ist als in der asiatischen Bevölkerung¹⁶. Das Trockene Auge tritt mit einer Prävalenz von 5 – 50 % in verschiedenen Altersgruppen auf, es kann durch den Mangel an Tränenflüssigkeit zur Beeinträchtigung des Sehens und im schlimmsten Falle zur Erblindung kommen¹⁷.

Die evaporative Form des Trockenen Auges („*evaporative dry eye*“, EDE) beschreibt eine veränderte Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit. Ursachen hierfür sind insbesondere obstruktive Erkrankungen der Meibomdrüsen oder das kongenitale Fehlen der Meibomdrüsen. Die Meibomdrüsen können zusätzlich durch Entzündungen wie die posteriore Blepharitis oder Rosazea geschädigt sein. Durch eine Beeinträchtigung der Meibomdrüsen kann z.B. der Lipidanteil verringert sein, was in einer erhöhten Evaporation resultiert und dadurch zum Syndrom des Trockenen Auges führen kann.

Der hypovolämische Mangel („*aqueous tear-deficient dry eye*“, ADDE) beschreibt eine verminderte Produktion von Tränenflüssigkeit. Hauptursache sind Entzündungen der TD, welche durch Infektionen oder durch Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden können. Zusätzlich zur pathologischen Beeinträchtigung der TD können Umweltfaktoren wie eine Exposition von Klimaanlage, Zug- oder Heizungsluft oder als weiterer Faktor das Tragen von Kontaktlinsen die Symptomatik eines Trockenen Auges verstärken. Anatomisch ursächlich kann ein Lagophthalmus durch schweren Exophthalmus, Fazialisparese oder nach Blepharoplastik sein. Dies führt durch die verstärkte Exposition der Augenoberfläche zu einer erhöhten Evaporation des Tränenfilmes und dadurch zum Trockenen Auge. Quantitativer Mangel wird auch vermehrt durch eine senile Hyposekretion verursacht und ist auf Grund des demographischen Wandels zunehmend¹⁸.

Ein häufiger Auslöser für einen schweren quantitativen Mangel an Tränenflüssigkeit stellt das Sjögren-Syndrom dar, hierbei handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung. Diese richtet sich hauptsächlich gegen die Tränen- und die Speicheldrüsen und spielt eine große Rolle bei der *Keratoconjunktivitis sicca*.

Darüber hinaus können Entzündungen der Drüsengänge, iatrogene Ursachen, neurologische Erkrankungen oder auch ein Vitamin-A Mangel die Funktion der TD beeinträchtigen und zu einem quantitativen Tränenmangel führen.

Klinik des Trockenen Auges

Die Symptome führen für die betroffenen Patienten häufig zu einer Einschränkung ihrer Lebensqualität. Es kommt zu einem Fremdkörpergefühl im Auge, Brennen, Juckreiz, Lichtscheu sowie zu Visusminderungen. Diese Symptome nehmen charakteristischerweise im Laufe des Tages zu. Eine Konjunktivitis und posteriore Blepharitis sind meist schon inspektorisch erkennbar, sie zeigen sich durch Entzündungszeichen wie Rötung und Schwellung. In schweren Fällen kann es zu Oberflächendefekten, Ulcera und zur Hornhautperforation mit konsekutivem Sehverlust kommen.

Qualität und Quantität des Tränenfilms können mittels der Untersuchung der Tränenfilmaufreißzeit (TBUT), Schirmer-Test und der Anfärbung des Hornhautepithels mit z.B. Fluoreszein, oder Lissamingrün evaluiert werden. Die minimale TBUT beträgt beim Gesunden ca. 10 Sek., der Schirmer-Test ist physiologisch, wenn nach 5 Min. ca. 15 mm des Indikatorpapiers verfärbt sind. Von deutlich pathologischen Werten spricht man bei weniger als 5 mm Verfärbung des Papiers⁷. Die Anfärbung des Hornhautepithels wird anhand einer Skala quantifiziert und bewertet, hier kann z.B. das *Oxford Grading* genutzt werden¹⁹. Histologisch zeigen sich in den betroffenen TD ggf. abgestorbene Azini, fibrotische Areale und eine Immunzellinfiltration, welche jedoch nur nach Biopsie oder Resektion der TD nachweisbar sind²⁰.

1.2.2 Beteiligung des Immunsystems

An der Pathogenese des Trockenen Auges ist die Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt. Es kommt durch die Beteiligung des Immunsystems zu einem Kreislauf, welcher die Entzündungsreaktion weiter potenziert²¹. Das Immunsystem besteht aus der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Zudem kann man zwischen akuten und chronischen Entzündungen unterscheiden. Eine akute Entzündung kann durch Infektion oder Trauma der Tränendrüse verursacht werden. Sie führt zu einer angeborenen Immunreaktion mit einer akuten, aber unspezifischen Entzündungsreaktion durch das Freisetzen von Zytokinen als humorale Komponente. Hierbei handelt es sich vor allem um die Sekretion von TNF- α sowie Interleukin-1 und -6²². Zudem sind die Zytokine

IL-11, IL-8, G-CSF und GM-CSF an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt²³. Ziel der akuten Entzündungsreaktion ist die Rekrutierung von Leukozyten zur Abwehr von Pathogenen in das Gewebe. Die lokale Reaktion des Gewebes auf die Zytokine besteht aus einer Weitstellung der Gefäße, welche eine vermehrte Perfusion zum Transport von Immunzellen ermöglicht²². Zusätzlich werden Endothelzellen aktiviert, welche auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle präsentieren. An diesen Adhäsionsmolekülen können Immunzellen anhaften und durch transendotheliale Emigration in das Gewebe eindringen, zudem wird die Chemotaxis von Leukozyten durch Chemokine aktiviert²². Ebenfalls werden Makrophagen aktiviert, welche sich teilweise bereits im lokalen Gewebe befinden und weitere, nicht-gewebeständigen Makrophagen, durch die Zytokine angelockt²⁴. Durch die Makrophagen werden Pathogene und Partikel aufgenommen, abgebaut und anschließend als Abbaufragmente über MHC-II-Komplexe auf ihrer Oberfläche präsentiert.

Es kann außerdem zu einer systemischen Immunreaktion kommen, wenn Zytokine in größeren Mengen freigesetzt werden und über das Blut zu weiteren Organen gelangen²². So werden in den Hepatozyten Akute-Phase-Proteine freigesetzt, aus dem Knochenmark werden zusätzliche Leukozyten freigesetzt und es kann Fieber entstehen²².

Von den dendritischen Zellen wird die erworbene Immunreaktion induziert, sie nehmen Antigene aus dem Extrazellulärraum auf²². Sobald ein Pathogen wahrgenommen wird, tritt die Dendritische Zelle in das periphere lymphatische Gewebe über und präsentiert das aufgenommene Antigen über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sobald die Dendritische Zelle einen Lymphknoten erreicht, können dort naive T-Zellen aktiviert werden²².

Durch die adaptive Immunreaktion kommt es zu einer spezifischen Immunantwort und im Verlauf auch zu einer Gedächtnisreaktion. Die zellulären Akteure dieser Reaktionen sind B- und T-Lymphozyten, während die humorale Komponente die von den B-Zellen freigesetzten Antikörper bilden²². Die erworbene Immunreaktion wird durch Antigene und ko-stimulatorische Signale ausgelöst²⁵. Zur Aktivierung von T-Zellen muss diesen das Antigen von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen, präsentiert werden. B-Zellen können durch den B-Zell-Rezeptor Antigene selbst erkennen²². Die Bindung an die T-Zellen erfolgt über den T-Zell-Rezeptor, unter anderem durch den CD 3-Komplex²². Die stimulierten T-Zellen entwickeln sich zu T-Helferzellen (CD4+) oder zytotoxischen T-Zellen (CD8+), welche an der weiteren Immunreaktion beteiligt sind.

Wenn der Auslösende Faktor im Gewebe verbleibt oder es zu einer immunologischen Fehlreaktion kommt, kann sich eine chronische Entzündungsreaktion entwickeln²⁶. In der Klinik des Trockenen Auges entwickelt sich diese beispielsweise beim Sjögren-Syndrom. Die chronische Entzündungsreaktion wird durch die prolongierte Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten charakterisiert. Die beteiligten Zytokine sind teilweise identisch mit der akuten Entzündung, es gibt jedoch auch für die chronische Entzündung spezifische Zytokine²³. Sie unterteilen sich in die humorale Komponente mit IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 und IL-13 und den zellulären Teil der chronischen Entzündung IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, Interferon, *transforming growth factor-beta* und TNF- α / β ²³. Im Verlauf der chronischen Entzündung kommt es zu reichhaltigen Veränderungen des ehemaligen Parenchyms, z.B. durch Fibrose oder Zunahme kleiner Blutgefäße. Dies geht häufig mit Funktionseinschränkungen des betroffenen Organs einher²⁶.

1.2.3 Therapie des Trockenen Auges

Bisherige Therapieansätze des Trockenen Auges beschränken sich vor allem auf eine symptomatische Behandlung. Hierbei kommen vornehmlich Tränenersatzmittel, entzündungshemmende Substanzen (Kortikosteroide, Cyclosporin A), sowie ein Verschluss der ableitenden Tränenwege z.B. mittels *Punctum Plugs* zum Einsatz. Den Patienten wird empfohlen ihre Umwelt an die Erkrankung anzupassen und z.B. Raumbefeuchter zu benutzen, trockene Heizungsluft zu meiden, Klimaanlage restriktiv zu nutzen und sich nicht in Zugluft aufzuhalten¹³.

Einer der wenigen kausalen, aber auch experimentellen Therapieansätze des Trockenen Auges ist die autologe Transplantation von Drüsengewebe der submandibulären Speicheldrüse (*Glandula submandibularis*, GS). Hierbei kann entweder die komplette Drüse oder ein Teil der Drüse transplantiert werden^{27,28,29}. Die Transplantation führt zwar zu einer subjektiven Verbesserung der Symptome, klinisch besteht jedoch weiterhin eine konjunktivale Hyperämie, Metaplasie, Infiltration von Entzündungszellen und eine Reduktion der Hornhautepithelzellen (angezeigt durch eine verstärkte FL)²⁸. Zudem bilden sich in einigen Fällen mikrozystische korneale Ödeme. Die negativen Auswirkungen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung des GS-Sekretes im Vergleich zu dem Tränenfilm sowie der geringere Osmolarität zurückzuführen³⁰. Die Patienten mit Trockenem Auge sekundär zum Sjögren-Syndrom weisen häufig auch entzündlich veränderte Speicheldrüsen mit herabgesetzter Funktion

auf, weshalb eine autologe Transplantation der GS bei diesen Patienten nicht in Frage kommt. Aus diesen Gründen stellt die Transplantation der GS keine optimale Therapieoption dar, wodurch es klinisch wichtig ist neue kausale Therapieansätze zu entwickeln.

1.2.4 Experimentelle Therapieansätze

Je nach Status der TD, teilen sich die experimentellen Ansätze zur kurativen Behandlung des Trockenen Auges in zwei Gruppen ein:

1. Bei einem kompletten Verlust des Drüsengewebes stellt die Rekonstruktion von funktionellem Drüsengewebe im Labor mit anschließender Transplantation einen vielversprechenden Weg für eine neue Therapieoption dar³¹. Um diesen Ansatz möglich zu machen, ist eine kompatible Matrix für die Besiedlung mit einer geeigneten Zellpopulation nötig. Die dabei implantierten Materialien müssen verschiedenste Kriterien erfüllen, wie die Biokompatibilität mit dem Empfängerorganismus, eine bestimmte Stabilität und Haltbarkeit und ebenfalls eine chirurgische Handhabbarkeit. Weiterhin muss eine vaskuläre und nervale Innervation gewährleistet werden.
2. Falls noch intaktes TD-Gewebe vorhanden ist, könnte eine Therapie, welche die Regeneration der TD *in situ* unterstützt oder anregt, eine vielversprechende Alternative darstellen³².

Im Falle des Vorliegens von funktionellem Restparenchym der TD in Patienten, stellt die Verbesserung bzw. die Wiederherstellung durch Regeneration der TD von beiden oben genannten Varianten die erfolgversprechendste dar. Die Vorteile dieses Ansatzes sind, dass zum einen keine große Operation für die Transplantation eines neuen Organs nötig ist und zum anderen der Patient nicht lebenslang Immunsuppressiva wegen möglicher Abstoßungsreaktionen des Fremdmaterials einnehmen muss.

Eine weitere mögliche Therapieoption stellt die Transplantation von MSC dar^{32,28}. Die MSC sind adulte multipotente stromale Zellen, welche die Eigenschaft besitzen sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren. In verschiedenen experimentellen Studien wurden MSC bereits zur Verbesserung der Regeneration des entsprechenden Gewebes eingesetzt^{33,34}. Beispiele hierfür stellen die Anwendung in der Neovaskulogenese nach Gefäßschäden, Osteo- oder Chondrogenese nach Frakturen oder Knorpelschäden, kornealer Regeneration sowie Typ 1 Diabetes dar³⁴. Aber auch bei akuten Verletzungen der Lunge, Entzündungen wie Sepsis und Autoimmunerkrankungen wie Lupus zeigten die MSC einen positiven Einfluss auf die Geweberegeneration³³.

Die Transplantation von MSC ist auch immunologisch vielversprechend, da sie keinen MHC-II-Komplex exprimieren. Durch diese Eigenschaft können die MSC nicht als Antigen-präsentierende Zelle agieren. Dies mindert die Gefahr einer Immunreaktion und ermöglicht es, die MSC allogent therapeutisch zu nutzen³⁵. Für die notwendige Gewinnung der MSC vor einer Transplantation konnten diese bereits aus diversen Geweben wie peripherem Blut, Molaren, Fett, amniotischer Flüssigkeit, der Nabelschnur, dem Knochenmark und der murinen TD³⁶ gewonnen werden. Das Sekretom aus murinen TD-MSC zeigte bereits in Studien einen positiven Effekt auf zuvor geschädigten TD-Zellen³⁷. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht endgültig geklärt und unterliegt weiteren Untersuchungen.

MSC haben neben ihrem Regenerationspotential auch immunmodulatorische Eigenschaften, welche besonders in Fällen eines entzündungsbedingten trockenen Auges durch eine Abmilderung der Entzündungsreaktion weiter zur Therapie beitragen könnten³⁸. Die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC konnten auf extrazelluläre Vesikel (EV) zurück geführt werden³⁹. Diese dienen als Mediator interzellulärer Kommunikation, ihr therapeutischer Effekt beim *Graft-Versus-Host-Disease* und chronischer Nierenerkrankung konnte bereits nachgewiesen werden³⁹. Durch MSC-EV werden die unspezifische und die erworbene Immunreaktion unterdrückt³⁹. In der TD konnten die MSC im Mausmodell bereits nachgewiesen werden^{36,32}. Auch konnte in ersten Untersuchungen bereits eine mögliche Beteiligung der MSC an der Geweberegeneration der TD nach einer Entzündungsreaktion gezeigt werden⁴⁰. Zudem sind die ethischen Bedenken beim Einsatz von MSC sind im Vergleich zu Embryonalen Stammzellen gering. Schließlich handelt es sich bei MSC um adulte Zellen, welche aus verschiedensten Gewebearten, wie zum Beispiel aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe gewonnen werden können.

Hinsichtlich des Therapieerfolges konnte bereits in Tiermodellen und in Studien am Patienten das Regenerationspotential der MSC beim Sjögren-Syndrom in den Speicheldrüsen und den TD gezeigt werden. Hierbei wurden pro-inflammatorische Zellen inhibiert und anti-inflammatorische Zellen stimuliert^{41,42}. Die Transplantation von MSC aus dem Knochenmark in vorgeschädigte Speicheldrüsen führte zu erhöhtem Speichelfluss, regenerierte die Zellstruktur der Azinus- und Ductuszellen und verringerte die Zahl apoptotischer Zellen⁴³.

Neben der Anwendung von MSC als Zelltherapeutika gibt es noch pharmakologische Ansätze zur Verbesserung der Funktion der TD. Hierbei wird aktuell vor allem die

Applikation von Wachstumsfaktoren wie HGF und TSG6 (*Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*) untersucht. Allerdings lässt sich durch diese Therapieoptionen nur die bereits pathologische Drüsenfunktion verbessern und unterstützen, jedoch keine Geweberegeneration erzielen³².

Die Gentherapie stellt eine weitere potentielle Therapieoption des Trockenen Auges dar, da diese sowohl *in vivo* als auch *in vitro*-Versuchen bereits erste Erfolge zeigen konnte⁴⁴. Bei der Gentherapie besteht die zugrundeliegende Methode aus einem Gentransfer mit Hilfe modifizierter viralen Vektoren (Adenoviren oder Adeno-assoziierte-Viren), welche die betreffenden Gene in die Zielzelle schleusen⁴⁴. Die Gentherapie ist jedoch durch eine möglicherweise ungezielte Insertation der Vektoren mit Risiken behaftet, welche zu einer Kanzerogenität oder auch zu einer möglichen Immunantwort des Patienten auf die Capsidproteine der Vektoren führen kann⁴⁴.

1.3 Mausmodelle des Trockenen Auges

Zur Erforschung von kurativen Therapieansätzen des Trockenen Auges mit Regeneration der TD *in situ* ist es nötig die Dynamik und den Charakter der Schädigung zu untersuchen. Hierfür müssen geeignete Tiermodelle etabliert und evaluiert werden. Es gibt bereits verschiedene Modelle, um die Pathophysiologie des Trockenen Auges zu imitieren (Zusammenfassung Schrader *et al.*⁴⁵). Die Mausmodelle sind unter den Tiermodellen am weitesten verbreitet, sie lassen sich gemäß der Pathophysiologie des Trockenen Auges ebenfalls in einen quantitativen- und einen qualitativen Tränenmangel einteilen. Es gibt eine Vielzahl von Modellen, von denen für die jeweilige Pathophysiologie das passende Modell ausgewählt werden kann⁴⁵. Zur Imitierung eines quantitativen Mangels sind die Mausstämme NOD.B10.H2^b oder Id3^{-/-} (beide zeigen eine T-Zell dominante Lymphozyteninfiltration der TD) geeignet. Sie stellen Modelle des primäres Sjögren Syndrom dar. Hiervon zu differenzieren ist das sekundäre Sjögren Syndrom welches durch den Mausstamm MRL/lpr generiert werden kann. Das Modell der NOD Maus eignet sich ebenfalls für die Imitierung der funktionellen Aspekte des Sjögren Syndroms, da hier Autoantikörper ähnlich wie beim Patienten mit Sjögren-Syndrom die Funktion der TD herabsetzen⁴⁵.

Ein qualitativer Mangel kann am besten durch Abwesenheit oder Atrophie der Meibomdrüsen wie bei der Tabby-Maus oder der APOC1 transgenen Maus untersucht werden. Zudem kann durch Umweltfaktoren (z.B. verminderte Luftfeuchtigkeit) und Stress (z.B. konstante forcierte Mobilisierung) die Evaporation des Tränenfilms

begünstigt werden. Dies führt zu verminderter Tränensekretion sowie zu einer verringerten Epithelzellichte (dargestellt durch eine erhöhte kornealer Anfärbung mit Fluoreszein).

Neben genetischen Mausmodellen des Trockenen Auges gibt es Mausmodelle mit induzierter Schädigung der Tränendrüsen. Dies hat den Vorteil, dass genetische Einflussfaktoren abseits der Tränendrüse keinen Einfluss haben und spezifisch die Schädigung der Tränendrüse untersucht werden kann^{40,46}.

Für unsere Studie haben wir die Ligatur des murinen Ductus (Ductusligatur, DL) der TD (wie bereits durch Liu *et al.* durchgeführt) mit der IL-1 α -Injektion (wie bereits durch Zoukhri *et al.* beschrieben) verglichen, um die Dynamik und den Charakter der Schädigung zu untersuchen und somit ein geeignetes Modell für die weiteren Untersuchungen zur Regeneration der TD aufzuzeigen^{46,40}.

1.3.1 Ductus Ligatur

Bei der DL wird der einzige exkretorische Ductus der extraorbitalen Tränendrüse mit einem Silikonschlauch ligiert. Die DL führt zu einer stabilen, beständigen und physischen Schädigung, wahrscheinlich entstanden durch den mechanischen Druck beim Rückstau der Tränenflüssigkeit. Diese Schädigung konnte durch Liu *et al.* durch eine makroskopische Verhärtung der TD aufgezeigt werden⁴⁶. Die TD verlor an Größe und Gewicht und veränderte ihre Färbung von klar zu milchig⁴⁶. Zudem zeigten sich vermehrt Lymphozyteninfiltrate, eine Zunahme von Ausführungsgängen und ein Untergang der Azinuszellen. Die detaillierte Prozesse der hervorgerufenen Entzündungsreaktion wurden jedoch nicht untersucht⁴⁶.

1.3.2 IL-1 α -Injektion

Die Injektion von Interleukin-1 α (IL-1 α) erfolgte direkt in das TD-Parenchym, dort ist das Zytokin IL-1 α an der Aktivierung von Entzündungsprozessen beteiligt⁴⁷. Dies konnte durch Zoukhri *et al.* durch eine schwere, passagere Entzündung der TD nach einer lokalen Injektion von IL-1 α in die TD demonstriert werden⁴⁰. Die schwere Entzündungsreaktion welche IL-1 α -Injektion in der TD auslöst, hat zusätzlich einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Azinuszellen. Durch den Verlust von Azinuszellen bedingt kommt es zu einer verringerter Tränenproduktion für einen begrenzten Zeitraum⁴⁰. Die IL-1 α -Injektion imitierte durch ihre passagere Entzündung mit anschließender spontaner

Regeneration des Gewebes eine akute Entzündung⁴⁰. Die kurze Entzündung führte zu einem passageren Verlust von Azinuszellen mit anschließender Regeneration⁴⁸.

1.3.3 Bedeutung der IL-1 α -Injektion und DL als Schädigungsmodelle

Die beiden Modelle Ductus Ligatur (DL) und IL-1 α Injektion haben in ersten Studien ihre Effektivität als Schädigungsmodell der TD gezeigt.

Das Schädigungsmodell der DL zeigt, dass durch die DL eine persistierende Veränderung der TD entsteht. Die Studie von Liu *et al.* über die DL ist zum aktuellen Zeitpunkt das einzige murine Schädigungsmodell, bei dem der Ductus der TD ligiert wurde. Es fehlt bisher der direkte Vergleich zu der transienten Schädigung nach IL-1 α -Injektion durch Zoukhri *et al.*.

Die unterschiedlichen Pathomechanismen der beiden Schädigungsmodelle stellen jeweils eine individuelle Herangehensweise und daraus jeweils resultierende individuelle Inflammation des Gewebes dar. Dies macht den Vergleich der beiden Varianten sehr wichtig und bietet die Grundlage für meine Untersuchungen. Die beiden Modelle weisen vergleichbare Anzeichen einer Entzündung wie Lymphozyteninfiltration, Verlust der Azinusstruktur, verminderter Tränenfluss und Anzeichen einer Regeneration auf. Wobei bisher weder die Inflammation noch die Schädigung der Azini detailliert miteinander verglichen wurden. Zudem unterscheiden sich IL-1 α -Injektion und die DL maßgeblich im Ablauf und Dauer dieser Vorgänge, wodurch jedes dieser Tiermodelle eine spezifische Rolle zur Erforschung des Trockenen Auges spielen könnte.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Dissertation ist es, anhand der Entzündungsreaktion die Qualität und Quantität einer Schädigung der murinen TD in zwei verschiedenen Schädigungsmodellen zu evaluieren. Zudem sollen die durch das Schädigungsmodell hervorgerufenen Funktionseinschränkungen als Indikator der Schwere des DED im Modell klinisch bewertet werden.

Diese beiden Schädigungsmodelle sind:

1. Die Ligatur des Tränenausführungsganges der extraorbitalen TD
2. die Injektion von IL-1 α in die extraorbitale TD

Für den direkten Vergleich der Modelle bezüglich der Schwere der Schädigung ist es notwendig, sie hinsichtlich fester Kriterien auszuwerten. Dafür werden klinische Parameter wie z.B. der Tränenfluss und die Schädigung der kornealen Augenoberfläche

mittels Fluoreszin Färbung erhoben und verglichen. Weiterhin werden die TD aus beiden Modellen in Hinblick auf Gewebeintegrität, Anzeichen von Gewebeschädigungen und Vorkommen von Entzündungsreaktionen und Immunzellen histologisch untersucht. Um den Gewebeuntergang und den Verlauf der Entzündung anhand der Immunzellen nachzuvollziehen, ist es geplant Hämatoxylin und Eosin - sowie immunhistologische Färbungen der TD mit spezifischen Markern für verschiedene Entzündungszellen durchzuführen.

Gleichzeitig soll evaluiert werden, ob eine spontane Regeneration der TD nach der Schädigung durch DL oder IL-1 α -Injektion möglich ist. Dies erfolgt anhand der histopathologischen und klinischen Auswertung der entsprechenden Parameter, wie z. B. der Gewebeintegrität und dem Vorkommen vitaler Zellen nach Schädigung. Dadurch kann das geeignetere Modell zur Untersuchung der Dynamik der Schädigung und Regeneration ausgewählt werden. Dies bildet die Grundlage zur Erforschung von Regenerativen Therapieansätzen zur Behandlung von ADDE in weiteren Studien.

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

ABC-Reagent	Vectastain, Vectorlabs, Burlingame, Kalifornien
Auswertungssoftware	ImageJ v.1.51d, National Institutes of Health, Maryland, USA
Mikroskopiersoftware	Leica Application Suite Version 4.6.1, Wetzlar
Eosin 0,5 % wässrig	Carl-Roth, Karlsruhe
EtOH	VWR (Avantor), Pennsylvania, USA
Faden 6/0	Prolene, Ethicon suture laboratories, New Jersey
F(ab) Fragment	Jackson-Immuno-Research, Pennsylvania, USA
Fluoreszein	Alcon (Novartis), Basel, Schweiz
Formalin	Carl-Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Carl-Roth, Karlsruhe
Isofluran	Piramal critical care, Pennsylvania, USA
IL-1 α (murin, rekombinant)	Peptotech, Hamburg
Ketanest	Pfizer, New York City, USA
Mikrotomklinge	Feather Typ A35
Mowiol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig
Ofloxacinsalbe	Bausch und Lomb, Heidelberg
Paraffin	Paraplast Plus, Leica Biosystems, Wetzlar
PFA 4 %	Carl-Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Rompun	Bayer, Leverkusen
Roti-Histokitt	Carl-Roth, Karlsruhe

Schirmer Test (<i>Phenol Red Thread Tear Test</i>)	Tianjin Jingming NewTechnological Development Co. Ltd
Silikonfaden	ARAM Corporation, Osaka, Japan
<i>Stitch</i> -Programm	Software Image Composite Editor (Version 2.0.3., Microsoft Research)
Triton-X-100	Carl-Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl-Roth, Karlsruhe
Xylol	VWR (Avantor), Pennsylvania, USA

Puffer

Citratpuffer pH 6,0	
• 0,1M C ₆ H ₈ O ₇	Merck, Darmstadt
• 0,1M C ₆ H ₇ NaO ₇	Carl-Roth, Karlsruhe
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	
• Na ₂ HPO ₄	VWR (Avantor), Pennsylvania, USA
• KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
• NaCl 99,5 %	Carl-Roth, Karlsruhe
• KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
<i>Tris-buffered saline</i> (TBS)	
• Tris Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
• NaCl 99,5 %	Carl-Roth, Karlsruhe

Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Wirt</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Produktnummer</u>	<u>Verdünnung</u>
CD3	Kaninchen	Monoklonal	Abcam Nr. ab16669	1:75
CD68	Maus	Monoklonal	Abcam Nr. ab31630	1:300
CD138	Maus	Monoklonal	Abcam Nr. ab34164	1:100

Sekundäre Antikörper

<u>Zielspezies</u>	<u>Wirt</u>	<u>Konjugierung</u>	<u>Produktnummer</u>	<u>Verdünnung</u>
Kaninchen	Pferd	Biotinyliert	Vector Labs BA-1100	1:300
Maus	Pferd	Biotinyliert	Vector Labs BA-2000	1:300

Geräte

Histologiemikroskop	Leica, DM4000B
Kühlplatte	Shandon Histocentre 3
Mikrotom	Leica RM 2255
Operationsmikroskop	Möller-Wedel Opthamic 900S
Wasserbad	Medithe Tissue Flotation Bath 55

2.2 Versuchsvorbereitung

2.2.1 Versuchstiere

Die Versuchsreihe wurde gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes mit dem Aktenzeichen 84-02-04.2013.A268 genehmigt und die Versuchstiere in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Das Versuchstierkollektiv bestand aus 100 männlichen C57BL/6J Mäusen (JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), welche zum Zeitpunkt der OP zwischen 8-10 Wochen alt waren. Dieser Stamm wurde aufgrund seiner ubiquitären Verfügbarkeit und Robustheit ausgewählt. Nach dem Transport wurde eine Akklimatisierungszeit von mindestens 7 Tagen eingehalten. Die Tiere wurden unter einem Tag-/Nacht-Rhythmus von je 12 h und freiem Zugang zu Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) und Wasser gehalten.

2.2.2 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden wie folgt in vier Gruppen aufgeteilt, zum einen die *Ductus lacrimalis* Ligatur Gruppe (DL) und zum anderen die IL-1 α Injektionsgruppe (IL-1 α). Sowie die passenden Kontrollgruppen zu beiden OP-Methoden, zum einen eine Sham Operation Gruppe für die DL und eine NaCl Injektion Gruppe für die IL-1 α Tiere (Abb. 3). Zusätzlich wurden komplett unbehandelte Tiere als Kontrollen für beide Versuchsgruppen genutzt.

Nachfolgend eine Aufstellung aller operierten Tiere und deren genaue Gruppenzugehörigkeit:

- *Ductus* Ligatur:
 - A) *Ductus lacrimalis* Ligatur für 3 Tage (n=6)
 - B) *Ductus lacrimalis* Ligatur für 7 Tage (n=6).
 - C) Eröffnung der DL an D7 mit Entnahme nach weiteren 7 Tagen (14 Tage Gruppe) (n=6)

- D) Eröffnung der DL nach D7 mit Entnahme nach weiteren 14 Tagen
(21 Tage Gruppe) (n=6)
- E) Eröffnung der DL nach D7 mit Entnahme nach weiteren 21 Tagen
(28 Tage Gruppe) (n=6)
- Die Sham Operation wurde jeweils zeitgleich zu der DL durchgeführt, jedoch ohne Ligatur (n=4)
- IL-1 α Injektion
 - A) Entnahme der Drüse nach Tag 1 (n=6)
 - B) Entnahme der Drüse nach Tag 2 (n=6)
 - C) Entnahme der Drüse nach Tag 3 (n=6)
 - D) Entnahme der Drüse nach Tag 5 (n=6)
 - E) Entnahme der Drüse nach Tag 7 (n=6)
- Die Kontrollgruppe NaCl Injektion wurde analog zur IL Gruppe durchgeführt mit n=4 pro Zeitpunkt
- Unbehandelte Tiere (n=4)

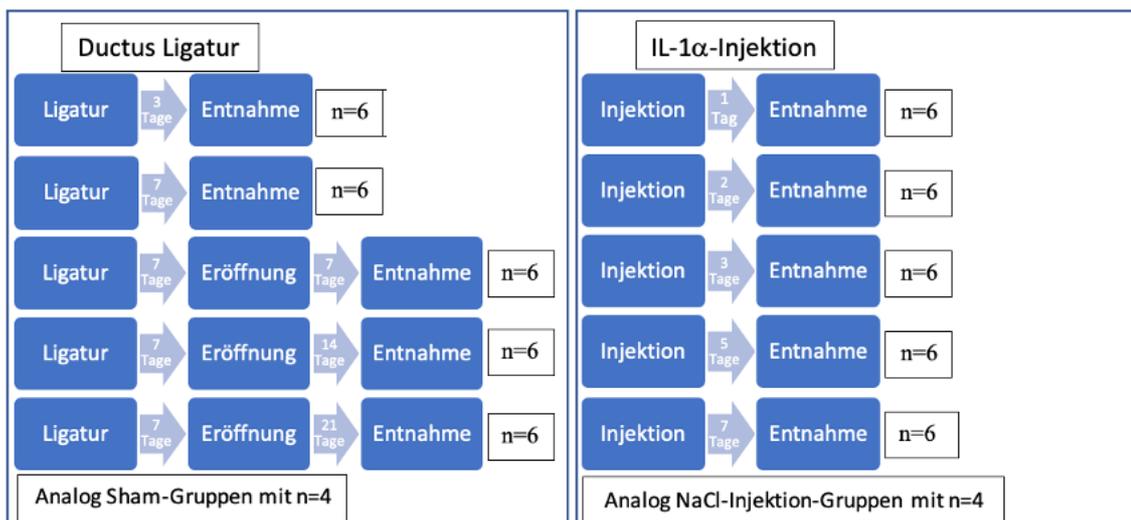


Abb. 3: Darstellung des Aufbaus der Versuchsgruppen, links die DL und rechts die IL-1 α -Injektion

2.3 Operation

2.3.1 Narkose

Das genutzte Narkosemittel bestand aus 80mg/kg Körpergewicht Ketanest (Esketaminhydrochlorid), 7,5 mg/kg Körpergewicht Rompun (Xylazin) verdünnt in 0,9 % NaCl. Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Injektion von 5 µl der Narkosemischung pro Gramm Körpergewicht eingeleitet. Nachdem das Tier keinen Stellreflex mehr zeigte, wurden beide Augen mit einer Bepanthen-Augensalbe bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.3.2 Allgemeiner Operationsteil

Nach dem Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde der Bereich zwischen rechtem Auge und rechtem Ohr mit Betaisodona Lösung desinfiziert. Anschließend erfolgte die Rasur des Operationsgebietes mittels eines Skalpells. Die Haut wurde mit einem circa 5mm langen Schnitt über dem Operationsgebiet eröffnet (siehe Abb. 4). Um die TD freizulegen, erfolgte unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskopes eine stumpfe Eröffnung des Gewebes bei Schonung der TD, ihrer Gefäße und des Tränenausführungsganges. Die TD stellte sich unmittelbar subkutan, kaudal-ventral des Ohrknorpels dar (Abb. 4), sie wurde während der Präparation möglichst wenig aus ihrer Umgebung abgelöst. Manipulationen an der Drüse selbst oder ihrer Kapsel erfolgten mit anatomischen Pinzetten, um die TD zu schonen.

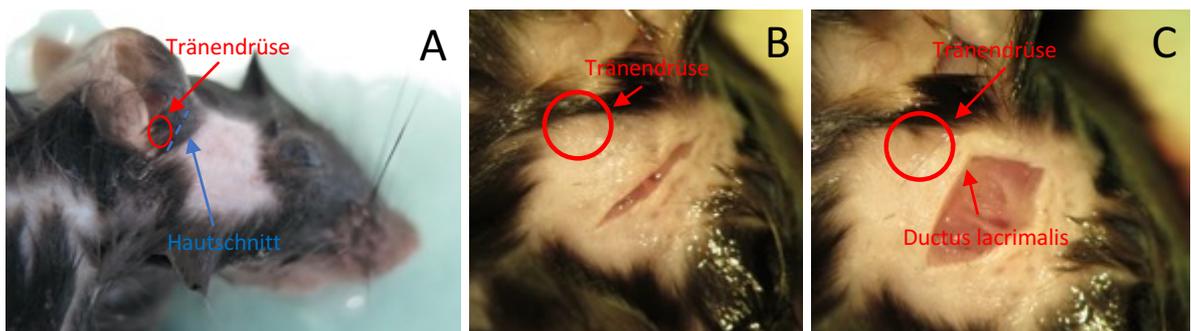


Abb. 4: Operationsgebiet: In Bild A deutet die blaue Linie an der rasierten Maus die spätere Schnittführung an, der rote Kreis markiert die Position der TD. Bild B zeigt den Schnitt nach Eröffnung, der rote Kreis deutet wieder die Position der TD an. Bild C zeigt den eröffneten Schnitt mit sichtbarem ventralem Teil der TD (Kreis) und frei liegendem Ductus lacrimalis (Pfeil)

Ductus Ligatur

Der *Ductus lacrimalis* wurde unter dem Präparationsmikroskop dargestellt und zeigte sich bei den meisten Tieren in Nähe einer pigmentierten Struktur ventral aus der TD ziehend Richtung medialer Lidwinkel (siehe Abb. 5). Durch leichten Zug auf das umliegende Bindegewebe wurde der *Ductus lacrimalis* angehoben und anschließend mit

einer spitzen Pinzette untertunnelt. Durch diesen Gewebetunnel wurden dann zwei Stück Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm, einem Außendurchmesser von 0,3 mm und einer Schlauchdicke von 0,05 mm gezogen und jeweils mit einem Knoten um den *Ductus lacrimalis* und das umliegende Gewebe festgezogen. Der Silikonschlauch wurde als Material für die DL gewählt da er durch seine elastischen Eigenschaften den Druck besser auf das Gewebe verteilte und dieses so weniger schädigt, weiterhin war der Knoten des Silikonschlauhes einfacher zu lösen als bei einem Faden.

Die Eröffnung der DL erfolgte jeweils an Tag 7 postoperativ unter Narkose, es erfolgte ein Hautschnitt entlang der vorhandenen Operationsnarbe. Die DL befanden sich in einem Fremdkörpergranulom, welches den Silikonfaden und den *Ductus lacrimalis* umgab. Nachdem dieses eröffnet wurde, konnten die Knoten mit Hilfe von Pinzetten gelöst und die Silikonschläuche entfernt werden. Der *Ductus lacrimalis* stellte sich über den Silikonschläuchen liegend intakt dar.

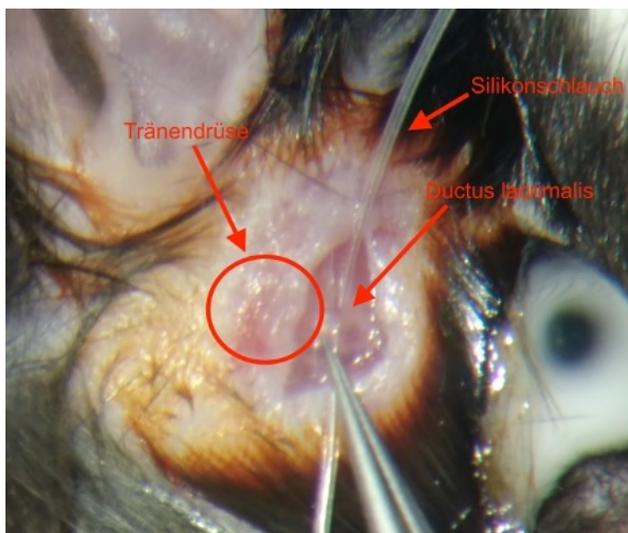


Abb. 5: Silikonschlauch mit darüberliegendem, intaktem *Ductus lacrimalis*

Sham-Operation

Die Sham-Operation erfolgte analog zu der DL, jedoch ohne jegliche Ligierung. Der *Ductus lacrimalis* wurde dargestellt und angehoben. Nachfolgend wurde die OP-Wunde vernäht. Es wurde darauf geachtet, den *Ductus lacrimalis* nicht zu beschädigen. Ebenso wurde bei der Sham-Operation an Tag 7 vorgegangen. Auch hier erfolgte eine analoge Eröffnung der OP-Narbe gefolgt von einer Anhebung des *Ductus lacrimalis*.

Interleukin-1 α Injektion

Das IL-1 α wurde in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 0,9 % NaCl gelöst. Nach der Darstellung der TD wurden mit einer 31 Gauge Hamilton Spritze 2 μl der IL-1 α -Lösung langsam in diese injiziert. Anschließend wurde die Spritze für ca. 30 Sek. im Drüsengewebe belassen, um eine Diffusion der Flüssigkeit in das umliegende Gewebe zu gewährleisten und einen Reflux durch den entstehenden Unterdruck bei dem Herausziehen der Kanüle zu vermeiden.

NaCl Injektion

Als Kontrolle für die IL-1 α Injektion wurden den Tieren analog zu der IL-1 α -Prozedur 2 μl 0,9 % NaCl injiziert.

2.3.3 Postoperative Versorgung

Nach der Durchführung der oben genannten Maßnahmen wurde die Wunde mit einem 6/0 nicht resorbierbarem Faden verschlossen und die Wunde mit einem lokalen Antibiotikum (Floxal Salbe mit 1mg Ofloxacin pro Gramm) versorgt. Als postoperative Analgesie wurde den Tieren 0,05 mg Buprenorphin pro kg Körpergewicht subkutan als Depot in den Nacken injiziert, zusätzlich wurde das Trinkwasser postoperativ für drei Tage mit 1mg/ml Tramadol versetzt.

2.3.4 Klinische Parameter

Fluoreszein-Färbung

Das korneale Epithel wurde postoperativ zu allen Untersuchungszeitpunkten ausgewertet. Dazu wurden den Tieren je ein Tropfen Fluoreszein in jedes Auge appliziert, mit einem Wattestäbchen der Überstand ohne Kontakt zur Kornea aufgesaugt und der Rest durch manuellen Lidschluss durch den Untersucher verteilt und überschüssiges Fluoreszein mit NaCl ausgespült. Die Tiere wurden zur Anregung der Fluoreszenz mittels einer Handspaltlampe begutachtet (siehe Abb. 6) und die Beschaffenheit des kornealen Epithels wurde anhand des *Oxford Gradings* auf einer Skala von 0-5 bewertet¹⁹.

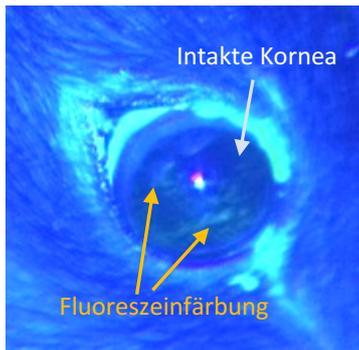


Abb. 6: Beispiel einer intakten Epithelzellschicht bei der murinen Kornea nach Applizierung von Fluoreszein unter der Blaulichtquelle.

Schirmer-Test

Zur Messung des Tränenflusses wurde ein Schirmer Test mittels phenolrot-impregnierter Wollfäden durchgeführt. Der Faden wurde hierfür mit einer Pinzette für 30 Sek. an den *lateralen Canthus* gehalten. Die Messung wurde sowohl vor der Induktion des Trockenen Auges als auch nach der jeweiligen Schädigung durchgeführt.

In unserer Studie wurden die Fäden von Tianjin Jingming NewTechnological Development Co. Ltd verwendet.

2.4 Histologische Aufarbeitung

4.4.1 Entnahme der Tränendrüse

Die Euthanasie erfolgte mittels zervikaler Dislokation unter Isofluran Narkose. Die TD wurden durch Eröffnen der Haut dargestellt und anschließend unter dem Mikroskop entnommen. Die linke, unbehandelte TD wurde ebenfalls entnommen.

2.4.2 Einbetten

Die entnommenen TD wurden nach einmaligem Waschen in PBS über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in einer Einbettkassette fixiert. Anschließend erfolgte das Wässern für 5 min. unter fließendem Leitungswasser. Die Proben wurden mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe in einem Entwässerungsautomaten über Nacht entwässert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen.

Das Entwässerungsprotokoll lautet dabei wie folgt:

Zu Beginn wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % EtOH für 45 min, 90 % EtOH für 120 min, 100 % EtOH I für 135 min, 100 % EtOH II für 190 min. und 100 % EtOH III für 100 min. inkubiert. Jetzt erfolgte ein erster Xylol Schritt für 75

min. und gefolgt von einem zweiten für 60 min. Des Weiteren wurden die Drüsen zunächst für 90 min. und dann erneut für 180 min. in Paraffin inkubiert.

2.4.3 Schneiden

Zum Anfertigen der Paraffinschnitte wurden die Blöcke zunächst bei -10°C gekühlt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Diese wurden zum Glätten kurz in ein 35°C warmes Wasserbad gelegt und von dort auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden diese über Nacht zum weiteren Glätten in einem Wärmeschrank bei 37°C gelagert.

2.4.4 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E) ist eine der am häufigsten genutzten Übersichtsfärbungen. Sie besteht aus dem basischem Hämalaun, welches die sauren und basophilen Strukturen (v.a. Zellkerne, DNA und das raue Endoplasmatische Retikulum (ER)) blau anfärbt und dem sauren Farbstoff Eosin, welcher azidophile und basische Strukturen (vor allem Zellplasmaproteine, Mitochondrien und das glatte ER) in Rot/Pink anfärbt. Zur Entparaffinierung der Schnitte, wurden diese für jeweils 5 min. drei Mal zur Entfernung des Paraplasts in Xylol getaucht gefolgt von einer absteigende Alkoholreihe mit 99 %, 96 % und 70 % Ethanol für ebenfalls jeweils 5min. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte für 3 min. in destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden sie für 5 min. mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend für 5 min. mit Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte die Färbung mit Eosin für weitere 2-3 min. Für die Einbettung durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe von 70 %, 96 % zu 99 % EtOH und anschließend dreimalig Xylol für jeweils 5 min. Die Schnitte wurden nachfolgend mit Roti Histokitt eingedeckt und lichtgeschützt bei RT gelagert.

2.3.5 Hämatoxylin und Eosin Auswertung

Zur Auswertung wurden die angefärbten Schnitte unter dem Mikroskop mit einem 10fach Objektiv in einzelnen Bildern komplett abfotografiert (siehe Abb. 7) und anschließend die Einzelfotos digital zu einem Gesamtbild des Tränendrüsenchnittes unter Nutzung der *Stitch Software: Image Composite Editor* zusammengefügt. Diese Bilder wurden verblindet durch zwei verschiedene Untersucher ausgewertet. Anschließend erfolgte die Auswertung digital mit Hilfe des Programms ImageJ⁴⁹ anhand von drei Parametern:

- Gesamtfläche des Tränendrüsenorgans: hierbei wurde das gesamte Drüsengewebe innerhalb der Kapsel gemessen. Die so vermessene Fläche enthielt sowohl vitales als auch apoptotisches Drüsengewebe.
- Fläche vitaler Azinuszellen: Hier wurde die Gesamtfläche aller nativ aussehenden Azinuszellen in Bezug auf die zuvor gemessene Gesamtfläche der TD gemessen.
- Immuneinfiltration: Die Immunzellen, größtenteils Granulozyten, wurden anhand ihres Phänotyps (Größe, Form) in der HE Färbung identifiziert und mittels eines Entzündungsscores ausgewertet. Es wurde eine Einteilung von 0-3 genutzt:
 - 0- Keine Infiltration
 - 1- Leichte Infiltration
 - 2- Mäßige Infiltration
 - 3- Starke Infiltration

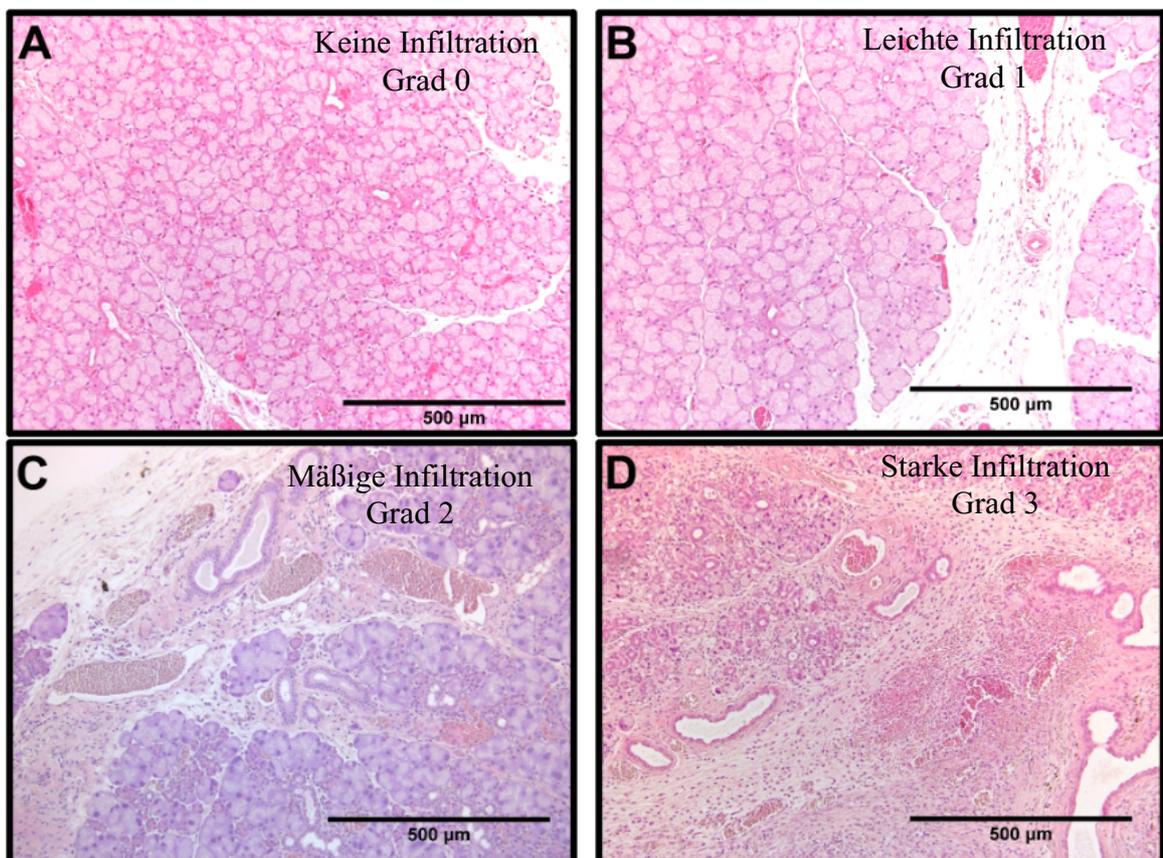


Abb. 7: Beispielbilder (in 100-fach Vergrößerung) des Scores für die Bewertung der Immuneinfiltration. In Bild A ist die Immuneinfiltration Grad 0 dargestellt, in Bild B Grad 1, in Bild C Grad 2 und in Bild D Grad 3.

2.4.6 Immunhistologische Färbungen mit DAB

Vor dem Färben wurden die Schnitte entparaffiniert (Siehe Abschnitt 2.4.4). Dann erfolgte eine Behandlung mit 0,15 % Triton-X-100 in PBS für 10 min. Die

Antigendemaskierung wurde anschließend mit 10 mM Citrat Puffer pH 6,0 in einem Garkocher für 35 min. durchgeführt, weiterhin wurden die Schnitte auf Eis für 30 min. gekühlt und dann in TBS-Tween 20 (0,05 %) pH 7,5 für 3 x 5 min. gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurden die Proben anschließend mit 3 % H₂O₂ in PBS für 30 min. inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift für 3 x 5 min. in TBS-T erfolgte ein Blockierungsschritt mit 25 % Pferdeserum in TBS für 45 min. Daran schloss die Inkubation mit F(ab) Fragmenten Anti-Maus IgG (H+L) für 1h (1:40 in TBS) um Gewebeeigene Immunglobuline zu blockieren. Die Schnitte bei denen der Sekundärantikörper sich nicht gegen Maus richtete wurden zeitgleich mit TBS inkubiert. Nach einem erneuten Waschen der Schnitte in TBS-T für 15 min. wurden die primären Antikörper in der passenden Verdünnung (siehe oben) in 2 % Pferdeserum angesetzt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Als Positiv-Kontrollgewebe für CD3, CD68 und auch für CD138 diente Lymphatisches Gewebe. Dieses wurden aus unbehandelten Mäusen entnommen und unter identischen Bedingungen wie die Drüsen eingebettet und immunhistologisch gefärbt.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x 5 min. mit TBS gewaschen. Nunmehr wurden die sekundären, Biotin gekoppelten Antikörper in mit einer Verdünnung von 1:300 in 2 % BSA in TBS angesetzt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1h bei RT.

Zeitgleich wurde das biotinylierte Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) für 30 min. mit Avidin inkubiert um einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-kit, Vector Labs) vorzubereiten.

Hiernach wurden die Schnitte in TBS für 3 x 5 min. gewaschen und anschließend der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30 min. bei RT auf die Schnitte gegeben.

Nun wurden die Schnitte mit TBS 3 x 5 min. gewaschen und dann Diaminobenzidin (DAB) als Substrat hinzugegeben. Die Inkubation des Substrats war für jeden Antikörper individuell und erfolgte unter mikroskopischer Sichtkontrolle. Für den CD3 Antikörper wirkte das Substrat 2 min. und 30 Sek., für den CD68 und CD138 Antikörper jeweils 3 min. Durch die Kombination von DAB mit HRP wurde das DAB zu einem braunen Farbstoff umgesetzt, was die Bindungsstellen der Primärantikörper sichtbar machte. Sobald das DAB genügend zu braunem Farbstoff umgesetzt war, folgte ein erneutes waschen in TBS. Für die Darstellung der Zellkerne wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 min. durchgeführt. Nach dem Bläuen für 5 min. in Leitungswasser

wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt. Als Kontrolle des Sekundär-Antikörpers wurden die Färbung identisch durchgeführt jedoch ohne primären AK.

2.4.7 Auswertung Immunhistologische Färbung

Im Anschluss an die DAB Färbung wurden die Drüsen unter dem Mikroskop bei 40x Vergrößerung beurteilt. Hierfür wurden bei den Antikörperfärbungen mit anti-CD68, anti-CD3 und anti-CD138 je 20 High Power Fields (HPF) ausgezählt. Für die Berechnung der Zellzahl/mm² (Z/mm²) wurde die Zellzahl/HPF mit der Fläche (0,307mm²) des HPF umgerechnet. Für die Berechnung der Zellen im HPF wurde die Anzahl der Zellen X durch die Fläche 0.307 mm² geteilt (X/0,307 mm²).

2.5 Statistik

Die Daten aus den Versuchen wurden mit Hilfe von Prism 7 (Graphpad, La Jolla, Kalifornien, USA) ausgewertet. Alle Werte werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (Mean \pm SD) angegeben. Der P-Wert wurde mit Hilfe eines *One-Way*-ANOVA mit Dunnet Test ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Parameter

3.1.1 Oxford Grading der Fluoreszin-Färbung

Sham Operation und Ductus Ligatur

Nach der Sham Operation (Abb. 8) zeigte sich ein Anstieg der FL nur an Tag 3 (3.00 ± 1.41 , $p=0.0053$). Die DL führte an Tag 3 (3.67 ± 0.52 , $p<0.0001$) und an Tag 7 (2.70 ± 0.84 , $p=0.0168$) zu einem signifikanten Anstieg des *Oxford Gratings* gegenüber der Kontrolle (1.58 ± 0.47). An den Tagen 14, 21 und 28 zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Augenoberfläche nach Sham-OP oder DL im Vergleich zur Kontrolle.

NaCl und IL-1 α -Injektion

Nach der Injektion von NaCl (Abb. 8) stieg das *Oxford Grading* an Tag 1 (3.00 ± 1.00 , $p=0.0401$) und an Tag 3 (3.37 ± 1.25 , $p=0.0010$) gegenüber der Kontrolle an. Nach der Injektion von IL-1 α stieg das *Oxford Grading* an Tag 1 (3.16 ± 1.17 , $p=0.0004$) und Tag 2 (3.41 ± 1.36 , $p<0.0001$) gegenüber der Kontrolle an. An Tag 5 und 7 zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Augenoberfläche nach NaCl oder IL-1 α -Injektion.

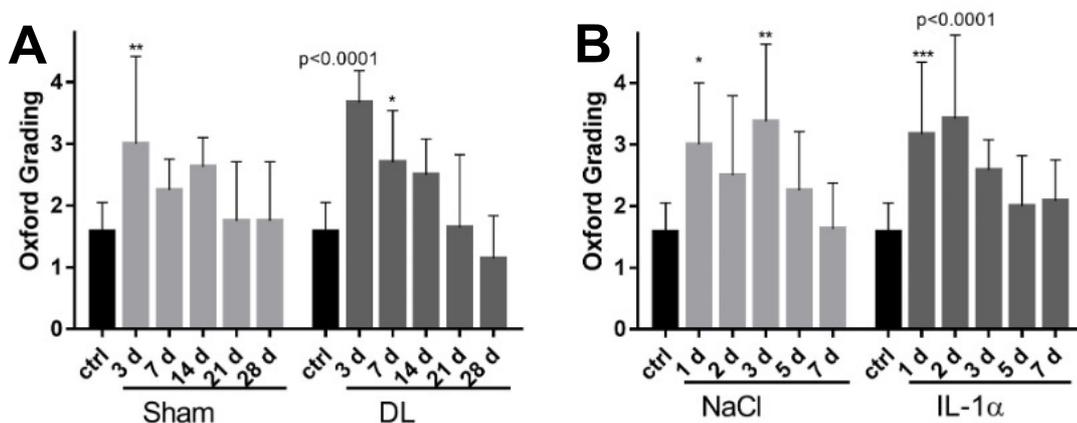


Abb. 8 (Modifiziert aus Publikation¹): Anstieg der FL in allen Gruppen postoperativ. An Tag 3 nach der DL (A) bzw. Tag 2 der Interleukin-1 α Injektion (B) zeigte sich die stärkste Anfärbung.

3.1.2 Schirmer Test

Es zeigte sich, dass bereits die basale Tränensekretion der Mäuse mit dem gewählten Schirmer-Test nicht messbar war. Der angefärbte Bereich des Wollfadens spiegelte lediglich den Bereich wider, welcher sich im Augenlid befand. Auf Grund der nicht messbaren basalen Tränensekretion konnten für den Schirmer Test keine Ergebnisse generiert werden.

3.2 Histologische Auswertung der Tränendrüsen Schädigung

3.2.1 Kontrolle

In den TD unbehandelter Tiere zeigte sich eine kompakte Azinusstruktur ohne Anzeichen einer Entzündung. Es waren weder Ödeme noch Fibrosen erkennbar und die Immunzellen zeigten keine vermehrte Kumulierung im Gewebe (siehe Abb. 9).

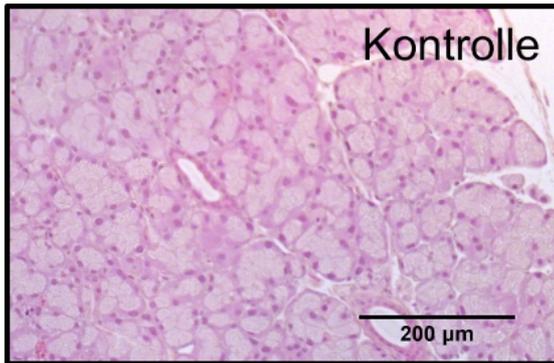
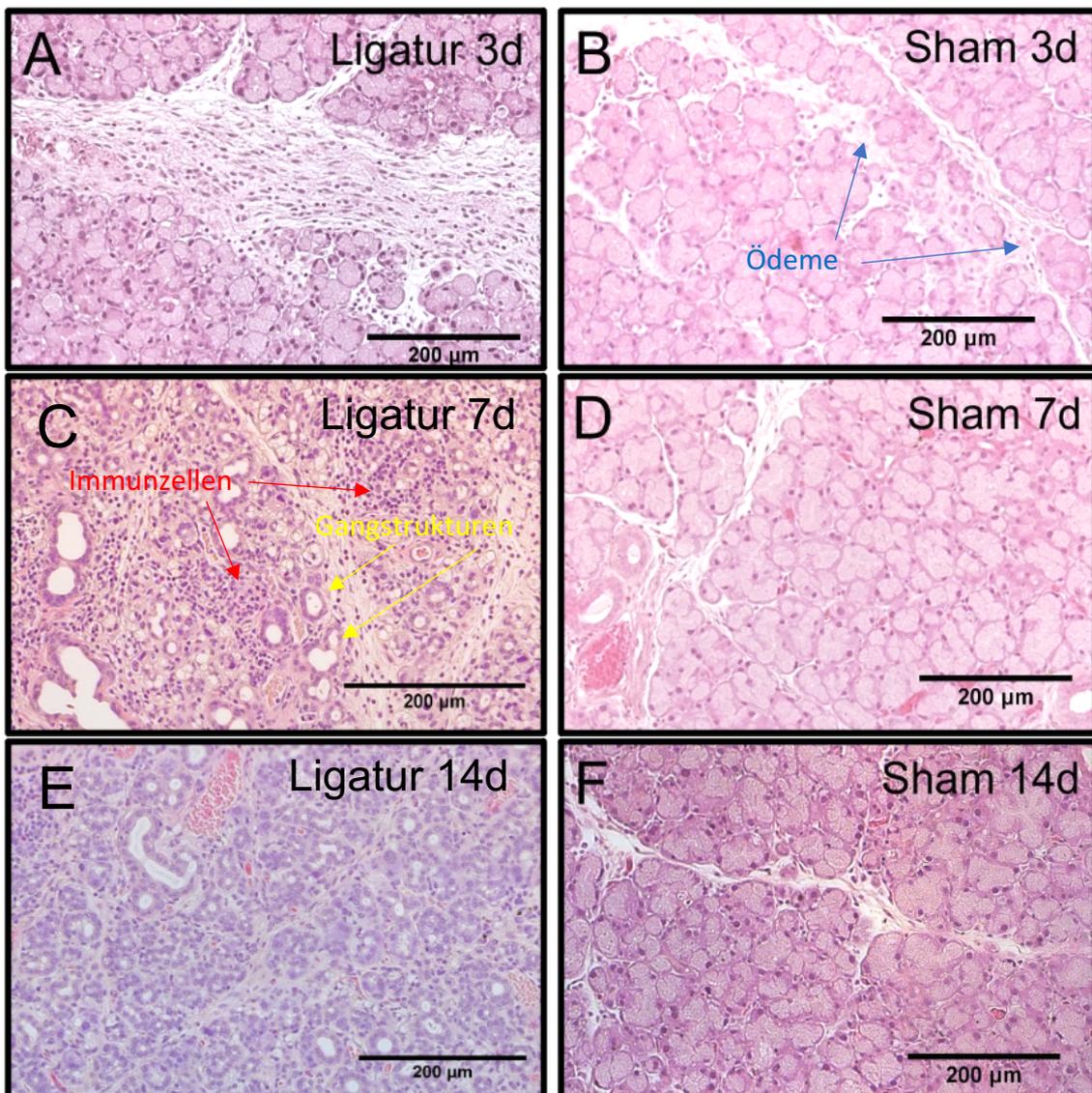


Abb. 9: Native TD (Kontrolle) in 200-fach Vergrößerung zeigt eine kompakte Azinusstruktur ohne Ödem oder Fibrose. Es waren nur wenige bis keine infiltrierenden Entzündungszellen sichtbar.

3.2.2 Ductus Ligatur gegenüber der Sham Operation

An Tag 3 nach der DL (Abb. 10) zeigte sich interstitielles Ödem und Fibrose sowie eine starke Infiltration von Immunzellen, die Azinusstruktur war gut erkennbar. Die infiltrierenden Immunzellen konnten aufgrund ihrer Zellmorphologie und Nukleusform als Granulozyten identifiziert werden. Vergleichend zeigte die Sham Operation (Abb. 10) nur geringe interstitielle Ödeme oder Fibrosen und deutlich weniger Immunzellen. Es zeigte sich eine gesteigerte Entzündungsreaktion an Tag 7 der DL, welche sich in einem weiteren Anstieg von ödematösem Gewebe, einer gesteigerten Anzahl von Immunzellen, starker Fibrose und resultierend einem beinahe kompletten Verlust der Azinusstruktur manifestierte. Im Vergleich dazu wies die Sham-operierten Drüse an Tag 7 deutlich weniger interstitielles Ödem, Fibrosen und Immunzellinfiltration auf. Das vitale Drüsenparenchym blieb zum großen Teil erhalten. Ab Tag 7 nach DL waren im Parenchym vergrößerte Gangstrukturen erkennbar, diese ließen bis Tag 28 nach. An Tag 14 (7 Tage nach Eröffnung der DL) war weiterhin ein starkes interstitielles Ödem, Fibrose, Immunzellinfiltration erkennbar. Zudem zeigte sich eine partielle Rückkehr der Azinusstruktur. Vergleichend war in den Sham operierten Drüsen an Tag 14 nur leichtes interstitielles Ödem, Fibrose und Immunzellinfiltration zu beobachten.

Mit 14 Tagen Regenerationszeit nach Eröffnung der DL zeigte sich an Tag 21 eine vermehrte Rückkehr der Azinusstruktur sowie einer Verringerung der Ödeme, Immunzellinfiltration und Fibrose. Zeitgleich (Tag 21) war in der Sham operierten Drüse wenig bis kein interstitielles Ödem, Fibrose oder Immunzellinfiltration mehr erkennbar. Zum Endzeitpunkt (21 Tage nach Eröffnung der DL) an Tag 28 zeigte sich ein progredienter Rückgang der Ödeme, Immunzellen und Fibrose sowie eine Rückkehr der Azinusstruktur. Die Sham operierte Drüse zeigte an Tag 28 keine Anzeichen von interstitiellem Ödem, Fibrose oder Immunzellinfiltration.



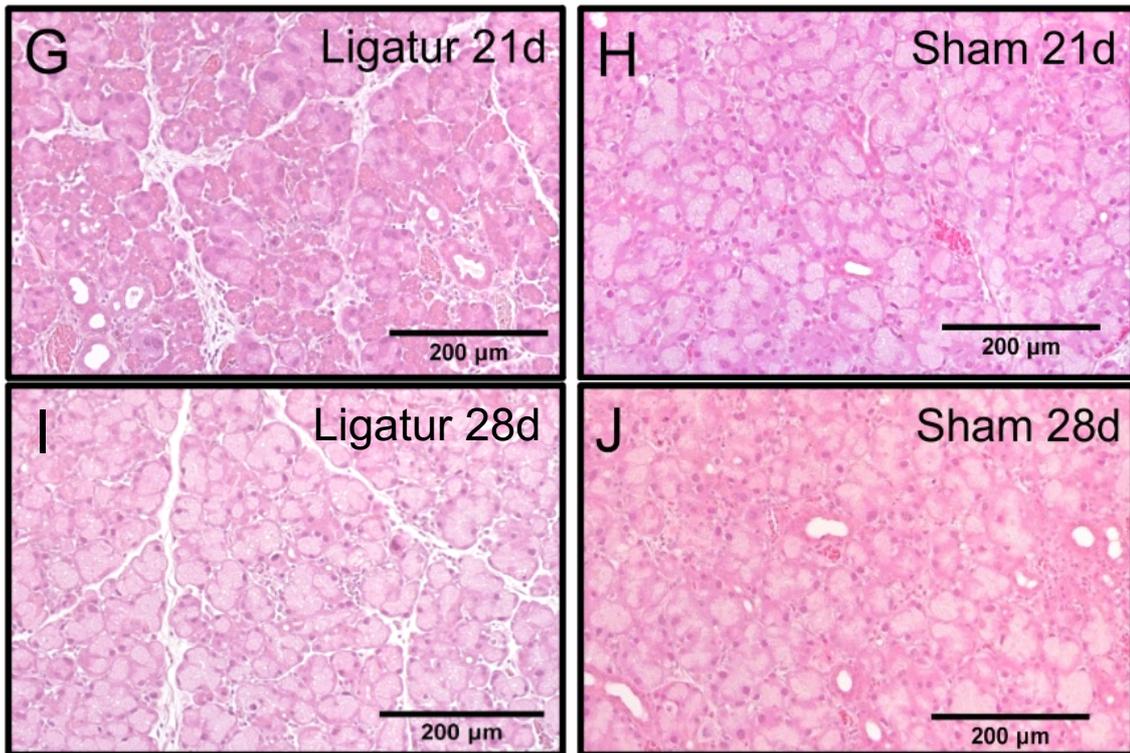
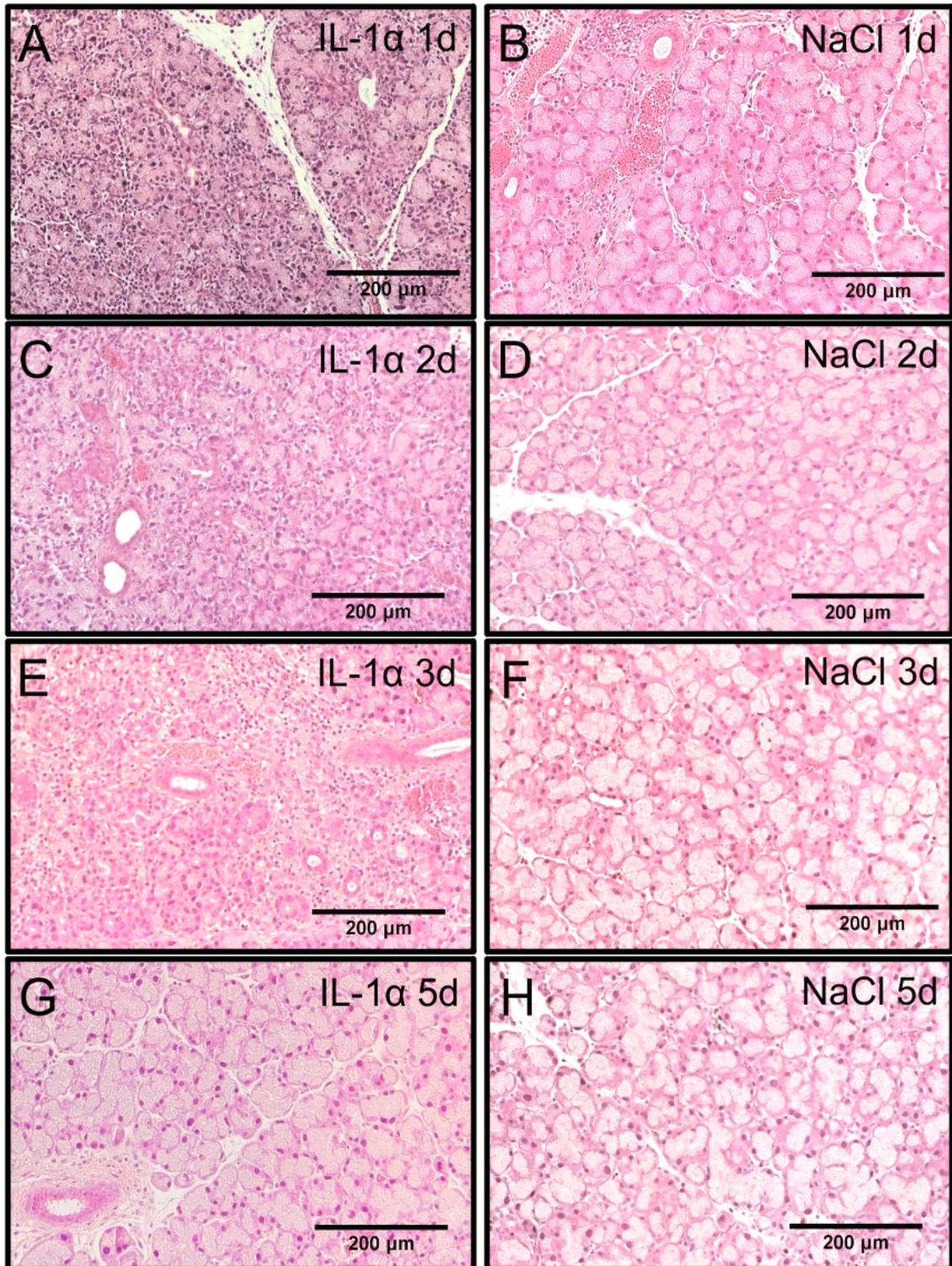


Abb. 10: Bilder A-J in 200-fach Vergrößerung zeigen den Vergleich zwischen der DL und der Sham Operation (Sham) an den verschiedenen Tagen (3, 7, 14, 21 und 28d). Ödeme (blau), Gangstrukturen (gelb) und Immunzellen (rot) sind mit Pfeilen markiert. Die Entzündung erreicht nach der DL an Tag 7 (C) ihr Maximum und verringert sich nachfolgend. Die Sham Operation führt ebenfalls zu einer passageren aber deutlich geringeren Entzündungsreaktion.

3.2.3 IL-1 α gegenüber NaCl Injektion

Einen Tag 1 nach der Injektion von IL-1 α (Abb. 11) wies die TD deutliche Zeichen einer Entzündungsreaktion auf. Die Azinusstrukturen der Drüse waren weitestgehend intakt, jedoch durch interstitielle Ödeme aufgelockert. Zudem fanden sich eine Fibrose und Immunzellinfiltration. Dem gegenüber zeigte die NaCl behandelte Drüse nur geringe interstitielle Ödeme oder Fibrosen. Die Entzündung zeigte sich an Tag 2 in der IL-1 α behandelten Drüse weiterhin sehr prominent. Die interstitiellen Ödeme, Fibrose und eine starke Infiltration von Immunzellen waren gut erkennbar. Wie an Tag 1 blieben die vitalen Azinusstrukturen zum großen Teil erhalten. Die NaCl behandelte Drüse zeigte an Tag 2 weiterhin nur leichte Anzeichen einer Entzündungsreaktion wie interstitielles Ödem, Fibrose und Immunzellinfiltration. Am 3. Tag nach der IL-1 α -Injektion war eine verminderte Entzündungsreaktion erkennbar, die interstitiellen Ödeme begannen sich zu verringern und die Zahl infiltrierter Immunzellen ließ nach. Ebenso bildeten sich Anzeichen einer Entzündungsreaktion in der NaCl behandelten Drüse im Vergleich zu Tag 2 noch weiter zurück. Die Entzündungszeichen waren an Tag 5 postoperativ in der

IL-1 α als auch in der NaCl behandelten Drüse weitestgehend inapparent, es stellte sich weitestgehend vitales Drüsenparenchym dar. Dieser Trend setzte sich an Tag 7 nach der IL-1 α Injektion bzw. der NaCl Injektion fort, es zeigte sich eine kompakte Azinusstruktur, ohne interstitielles Ödem, weitestgehend frei von Immunzellen.



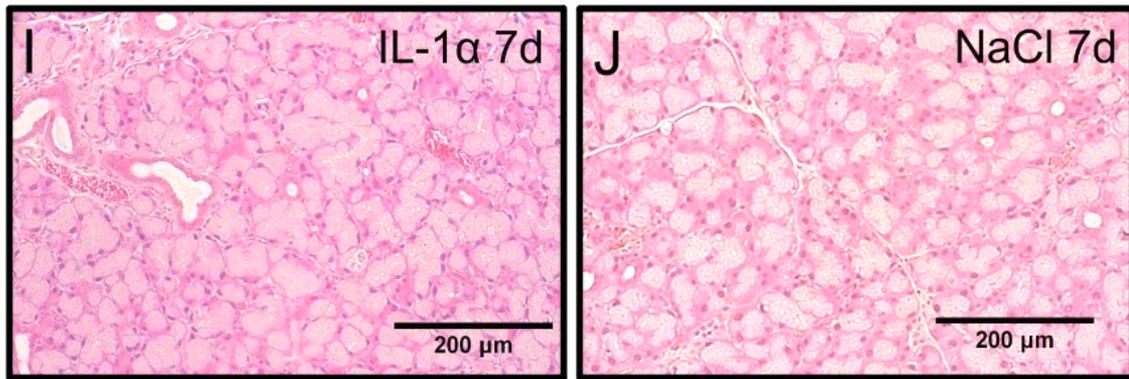


Abb. 11: Bilder A-J in 200-fach Vergrößerung zeigen den Vergleich zwischen der Injektion von IL-1 α (A, C, E, G und I) und NaCl (B, D, F, H und J) an den verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion (1,2,3,5 und 7d). Die Entzündung erreicht in den IL-1 α behandelten Drüsen an Tag 1 (A) ihr Maximum und verringert sich nachfolgend. Die NaCl-Injektion führt ebenfalls zu einer passageren aber deutlich geringeren Entzündungsreaktion.

3.2.4 Veränderungen in der Fläche des Gesamtdrüsenorgans

Ligatur und Sham Operation

Die DL (Abb. 12) führte zu einer signifikanten Verringerung des Drüsenparenchyms gegenüber der Kontrolle (91.60 % \pm 3.25 %) an Tag 3 (61.88 % \pm 5.26 % $p < 0.0001$) und einem Minimum der parenchymalen Zellfläche an Tag 7 (47.76 % \pm 11.20 % $p < 0.0001$). Nach Eröffnung der DL zeigte sich eine Zunahme der Parenchymfläche über den Zeitverlauf, zunächst an Tag 14 (57.76 % \pm 4.32 % $p < 0.0001$), Tag 21 (70.38 % \pm 7.53 %, $p < 0.0001$) und schließlich an Tag 28 (78.73 % \pm 4.20 % $p = 0.0204$). Die Sham Operation führte zu einer geringen Abnahme des Parenchyms, es kam jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung.

IL-1 α und NaCl Injektion

Die Injektion von IL-1 α (Abb. 12) führte zu einem signifikant verringerten Anteil des Drüsenparenchyms gegenüber der Kontrolle (91.60 % \pm 3.25 %). Die minimale Fläche des Parenchyms zeigte sich an Tag 1 (73.16 % \pm 8.79 %, $p = 0.0001$) und Tag 2 (77.14 % \pm 7.54 %, $p = 0.0037$), ab Tag 3 führte die IL-1 α -Injektion nur noch zu nicht signifikanten Verminderungen des Parenchyms. Nach NaCl Injektion kam es zu minimaler, nicht signifikanter Abnahme der parenchymalen Zellfläche.

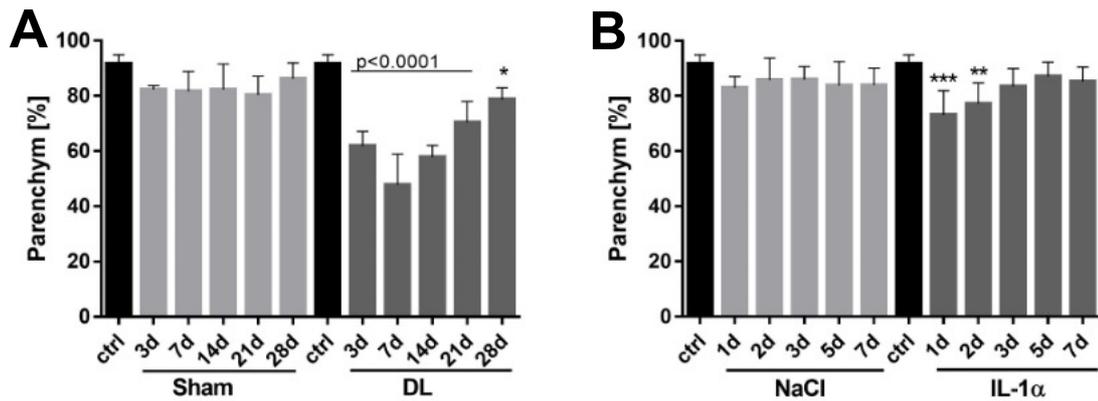


Abb. 12 (Modifiziert aus Publikation¹): Berechnung der parenchymalen Zellfläche (%) der TD zeigte eine signifikante Reduktion der parenchymalen Zellfläche von Tag 3 bis Tag 28 (A) nach DL wobei nach Tag 7 (Eröffnung) ein Anstieg zu detektieren war. Die IL-1 α Injektion (B) führte zu einer signifikanten Reduktion an Tag 1 und Tag 2. Die Kontrollgruppen, NaCl (A) und Sham (B) führte zu einer kleineren, nicht signifikanten Abnahmen der Zellfläche.

Vergleich von Schädigung und Regeneration der gesamten Parenchymfläche nach Interleukin-1 α -Injektion und Ductus Ligatur

Tag 1 nach IL-1 α -Injektion und Tag 7 nach DL stellten, wie in Abb. 12 dargestellt, in den jeweiligen Gruppen den Zeitpunkt mit der Maximalen Verringerung des parenchymalen Drüsengewebes gegenüber der Kontrolle dar. Im Vergleich der beiden Zeitpunkte zeigte sich (Abb. 13), dass durch die DL an Tag 7 (47.76 % \pm 11.20 %, p=0.0002) eine signifikant verringerte Fläche des Drüsengewebes gegenüber der IL-1 α -Injektion an Tag 1 (73.16 % \pm 8.79 %, p=0.0001) verursacht wurde.

Tag 7 nach IL-1 α -Injektion und Tag 28 nach DL waren die Zeitpunkte der jeweiligen Gruppen, an denen die Regeneration des Drüsengewebes am weitesten fortgeschritten war bzw. Endzeitpunkt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen IL-1 α -Injektion und DL.

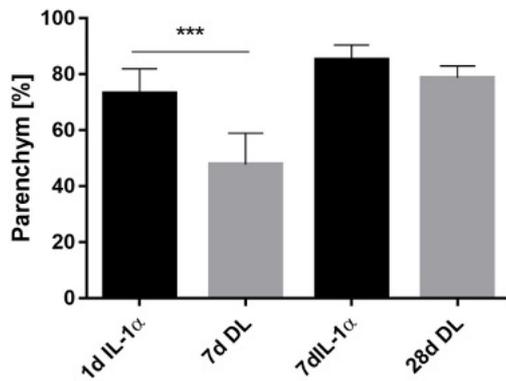


Abb. 13: Vergleich von Schädigung und Regeneration der gesamten Parenchymfläche nach IL-1 α -Injektion und DL. Sie ist an Tag 7 nach DL (minimale Parenchymfläche in DL-Gruppe) signifikant geringer als an Tag 1 nach IL-1 α Injektion (minimale Parenchymfläche in IL-1 α -Gruppe). Dieser Unterschied besteht zwischen Tag 7 der IL-1 α -Injektion und Tag 28 der DL nicht (jeweiliger Zeitpunkt mit maximaler Regenerationszeit bzw. Endzeitpunkt).

3.2.5 Veränderungen des Anteils von Azinuszellen an der Gesamtfläche

Ductus Ligatur und Sham Operation

Die Sham Operation (Abb. 14) führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der Fläche vitaler Azinuszellen gegenüber der Kontrolle (90.87 % \pm 3.47 %). Anders die DL, diese führte zu einer Reduzierung der Fläche ab Tag 3 (45.27 % \pm 14.38 %, $p < 0.0001$) und erreichte an Tag 7 ihr Minimum (3.88 % \pm 5.17 %, $p < 0.0001$). Nach der Eröffnung der DL an Tag 7 nahm die Fläche stetig bis Tag 28 zu (54.67 % \pm 11.47 %, $p < 0.0001$), wobei die Fläche der vitalen Azinuszellen an Tag 28 weiterhin gegenüber der Kontrolle signifikant verringert war.

IL-1 α und NaCl Injektion

Die Injektion von NaCl (Abb. 14) führte, zu keiner signifikanten Verminderung der Fläche vitaler Azinuszellen gegenüber der Kontrolle (90.87 % \pm 3.47 %). Hingegen ließ die Injektion von IL-1 α die Fläche vitaler Azinuszellen an Tag 1 (64.39 % \pm 10.10 %, $p = 0.0003$) und Tag 2 (63.63 % \pm 16.29 %, $p = 0.0002$) im Vergleich mit der Kontrolle zurückgehen. Ab Tag 3 kam es zur Zunahme der vitalen Azinusstrukturen, so dass an Tag 5 die Werte vergleichbar zur Kontrolle waren.

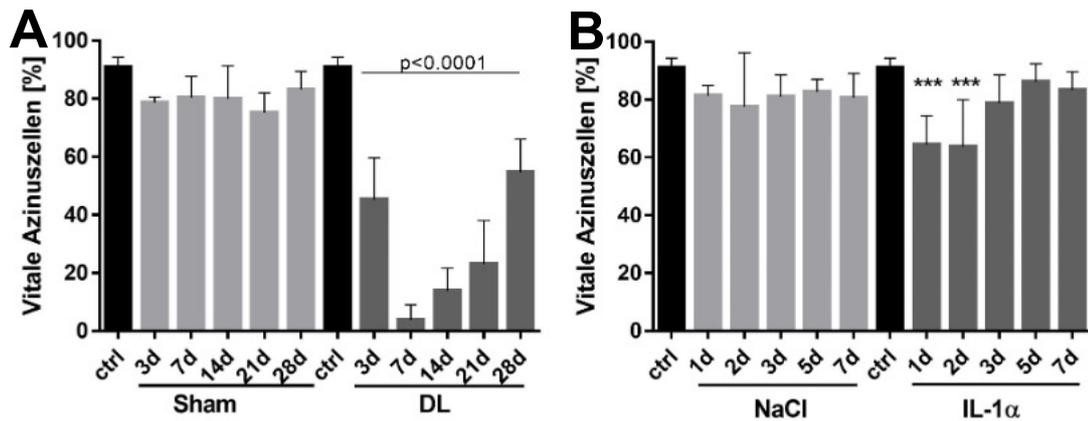


Abb. 14 (Modifiziert aus Publikation¹): Berechnung der vitalen Azinuszellen (%) der TD. Während die Sham Operation (A) keine signifikanten Veränderungen verursachte, zeigte sich nach DL (A) ein fast kompletter Verlust der vitalen Azinuszellen an Tag 7 mit anschließender Teil-Regeneration. Nach IL-1 α -Injektion (B) zeigte sich an Tag 1 und 2 ein Abfall der vitalen Azinuszellen, die NaCl-Injektion (B) führte nur zu geringeren, nicht signifikanten Veränderungen.

Vergleich der vitalen Azinuszellen nach Interleukin-1 α -Injektion und Ductus Ligatur

Wie bereits in Abb. 14 dargestellt, wiesen Tag 1 nach IL-1 α -Injektion und Tag 7 der DL die stärkste Schädigung der TD auf. Tag 1 nach der IL-1 α -Injektion (64.39 % \pm 10.10 %) präsentierte dabei signifikant mehr Fläche vitaler Azinuszellen als Tag 7 der DL (3.88 % \pm 5.17 %, $p < 0.0001$). Tag 7 nach IL-1 α -Injektion und Tag 28 nach DL waren die betrachteten Endzeitpunkte (siehe Abb. 15). Hier zeigte sich, dass an Tag 7 nach der IL-1 α -Injektion (83.31 % \pm 6.36 %) eine signifikant größere Fläche an vitalen Azinuszellen sichtbar war als nach der DL an Tag 28 (54.67 % \pm 11.47 %, $p = 0.0001$).

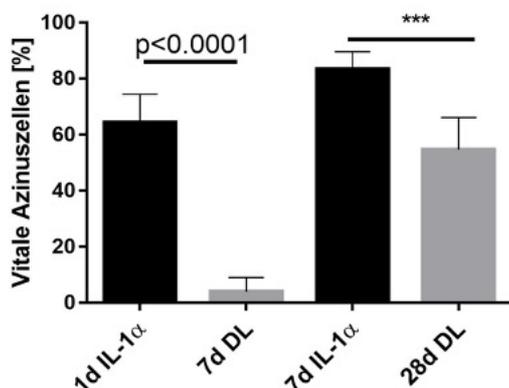


Abb. 15: Vergleich von Schädigung und Regeneration der Fläche vitaler Azinuszellen nach IL-1 α -Injektion und DL. Sie ist an Tag 7 der DL (minimale Fläche vitaler Azinuszellen in DL-Gruppe) signifikant geringer als an Tag 1 nach IL-1 α -Injektion (minimale Fläche vitaler Azinuszellen in IL-1 α -Gruppe). Im Vergleich zwischen Tag 28 der DL und Tag 7 der IL-1 α -Injektion (jeweiliger Zeitpunkt maximaler Regeneration bzw. Endzeitpunkt) ist dieser Unterschied ebenfalls fest zu stellen, jedoch weniger signifikant.

3.2.6 Infiltration von Immunzellen

Hier soll der Entzündungsstatus anhand einer Übersichtsfärbung betrachtet werden, dafür wurden Immunzellen im TD-Gewebe erfasst (siehe Abb. 16). Es waren bereits in den Kontrolldrüsen Immunzellen im Gewebe nachweisbar, diese waren sowohl zwischen den Azinuszellen als auch im Bindegewebe vorhanden. Die Zahl der gemessenen Immunzellen veränderte sich je nach Schädigung individuell.

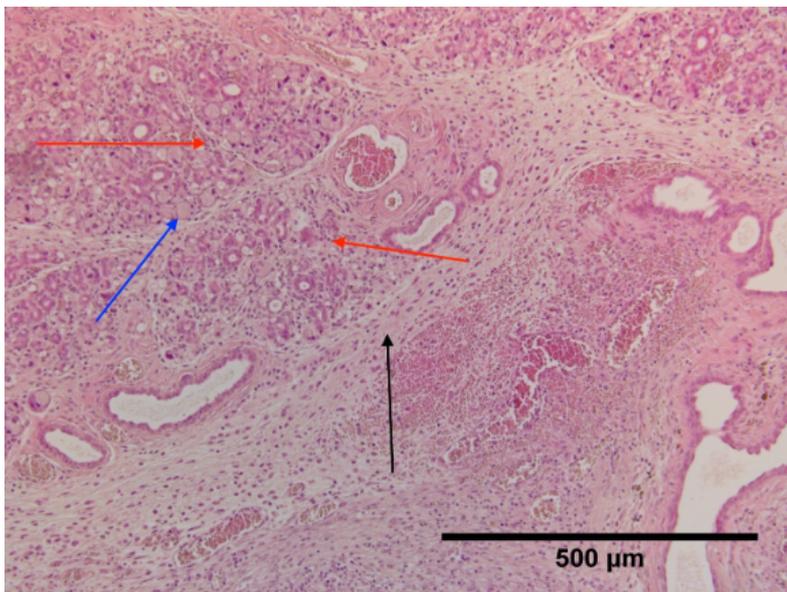


Abb. 16: HE Färbung der TD an Tag 7 nach DL in 100-fach Vergrößerung. Das Drüsengewebe ist durch Immunzellen infiltriert (roter Pfeil) welche sich zwischen den Azinuszellen und im Bindegewebe (schwarzer Pfeil) finden. Es sind teilweise vitale Azinuszellen erkennbar (blauer Pfeil).

Ductus Ligatur und Sham Operation

Die DL (Abb. 17) resultierte in einem Ansteigen des Infiltrationsscores gegenüber der Kontrolle (0.75 ± 0.50) ab Tag 3 (2.83 ± 0.41 , $p < 0.0001$) für den gesamten Beobachtungszeitraum bis einschließlich Tag 28 (2.16 ± 0.41 , $p < 0.0001$). Die Sham Operation führte nicht zu einem signifikanten Anstieg.

IL-1 α und NaCl Injektion

Die Injektion von IL-1 α (Abb. 17) führte an Tag 1 (2.66 ± 0.52 , $p = 0.0014$) zu einer signifikanten Steigerung des Infiltrationsscores gegenüber der Kontrolle (0.25 ± 0.50), ab Tag 2 bestand kein signifikanter Unterschied mehr gegenüber der Kontrolle.

Die NaCl Injektion führte nicht zu einem signifikanten Anstieg des Scores gegenüber der Kontrolle. Auch hier konnten die infiltrierenden Immunzellen als Granulozyten identifiziert werden.

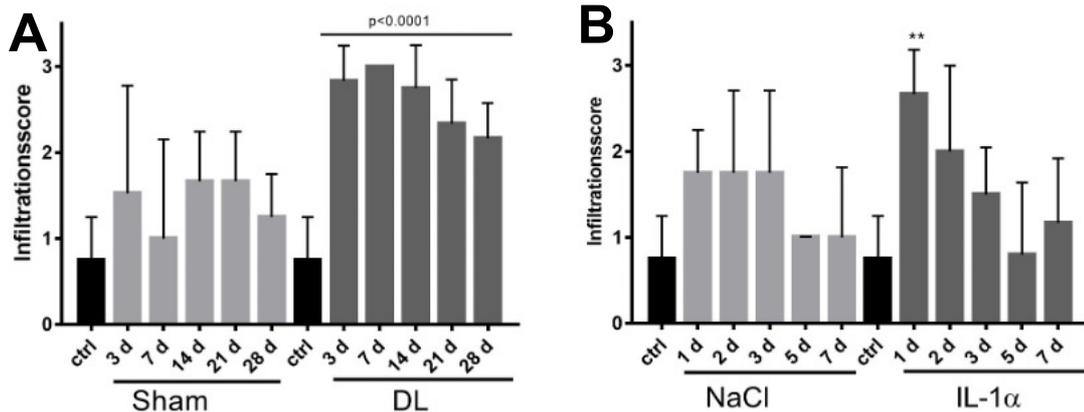


Abb. 17 (Modifiziert aus Publikation¹): Vergleich der Immunzellinfiltration zwischen der DL und der Sham Operation (A), an Tag 3-28 der DL stieg der Infiltrationsscore signifikant an. Dies war nach der Sham Operation nicht zu beobachten. Nach der IL-1 α -Injektion (B) war die Immunzellinfiltration an Tag 1 signifikant gesteigert, während dies nach der NaCl-Injektion nicht der Fall war.

3.3 Immunhistologie Auswertung

Nachdem der Entzündungsstatus anhand einer Übersichtsfärbung betrachtet wurde, sollen die Immunzellen nun durch immunhistologische Färbungen charakterisiert werden. Die dunkel angefärbten Immunzellen sind im Parenchym der TD gut erkennbar.

3.3.1 CD3 (T-Zellen)

Ductus Ligatur und Sham Operation

Wie in Abb. 20 dargestellt, zeigten die unbehandelten TD (Kontrolle) bereits CD3 positive T-Zellen ($7.05 \text{ Z/mm}^2 \pm 5.05 \text{ Z/mm}^2$). Im Vergleich hierzu stieg die Anzahl CD3 positiver Zellen an Tag 3 (siehe Abb. 18) der DL an ($37.79 \text{ Z/mm}^2 \pm 14.42 \text{ Z/mm}^2$, $p < 0.0001$). An Tag 7 ($29.86 \text{ Z/mm}^2 \pm 22.65 \text{ Z/mm}^2$, $p < 0.0001$) kam es bereits zum Rückgang der CD3 positiven Zellen. An Tag 21 der DL bestand kein signifikanter Unterschied mehr gegenüber der Kontrolle. Die Sham Operation führte zu einem signifikanten Anstieg in der Anzahl CD3 positiver Zellen an Tag 3 ($31.35 \text{ Z/mm}^2 \pm 25.92 \text{ Z/mm}^2$, $p < 0.0001$) und Tag 28 ($18.73 \text{ Z/mm}^2 \pm 9.23 \text{ Z/mm}^2$, $p = 0.0356$), erkennbar in Abb. 19.

IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion

Die IL-1 α -Injektion (Abb. 20) führte bis auf Tag 7 ($46.91 \text{ Z/mm}^2 \pm 28.51 \text{ Z/mm}^2$, $p < 0.0001$) zu keinem signifikanten Anstieg der CD3 positiven Zellen gegenüber der Kontrolle ($7.05 \text{ Z/mm}^2 \pm 5.05 \text{ Z/mm}^2$). Die NaCl-Injektion führte an keinem der Tage zu einem signifikanten Anstieg der CD3 positiven Zellen.

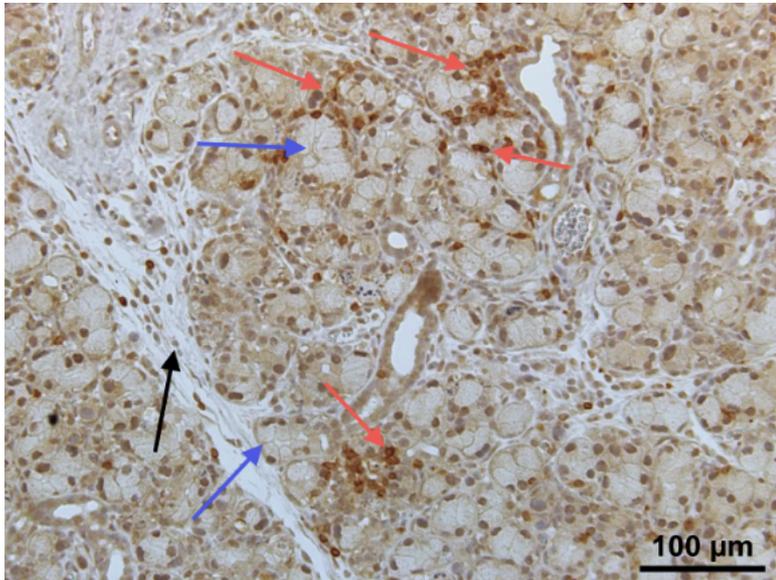
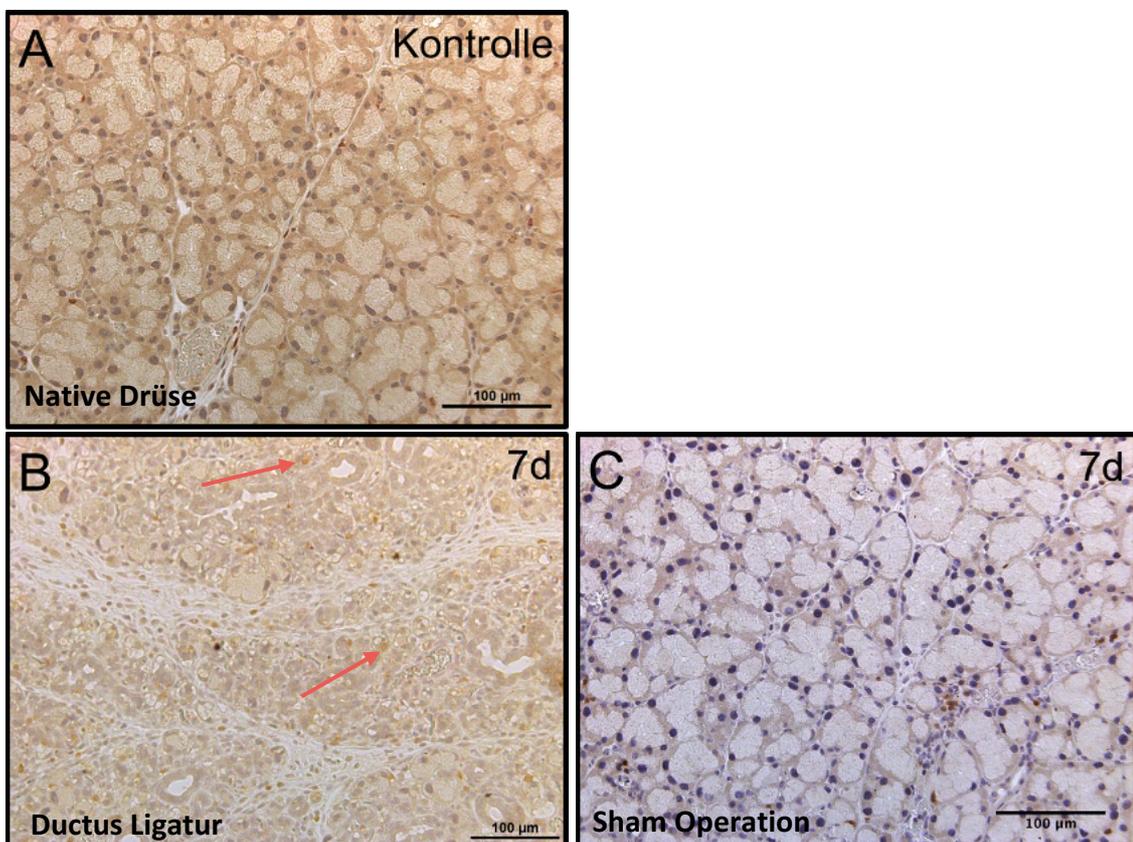


Abb. 18: Beispielbild einer immunhistologischen Färbung von CD3 positiven Zellen (roter Pfeil) in 200-fach Vergrößerung, in einer TD 3 Tage nach DL, welche sich im Parenchym zwischen den Azinuszellen (blauer Pfeil) und Bindegewebe (schwarzer Pfeil) befinden.



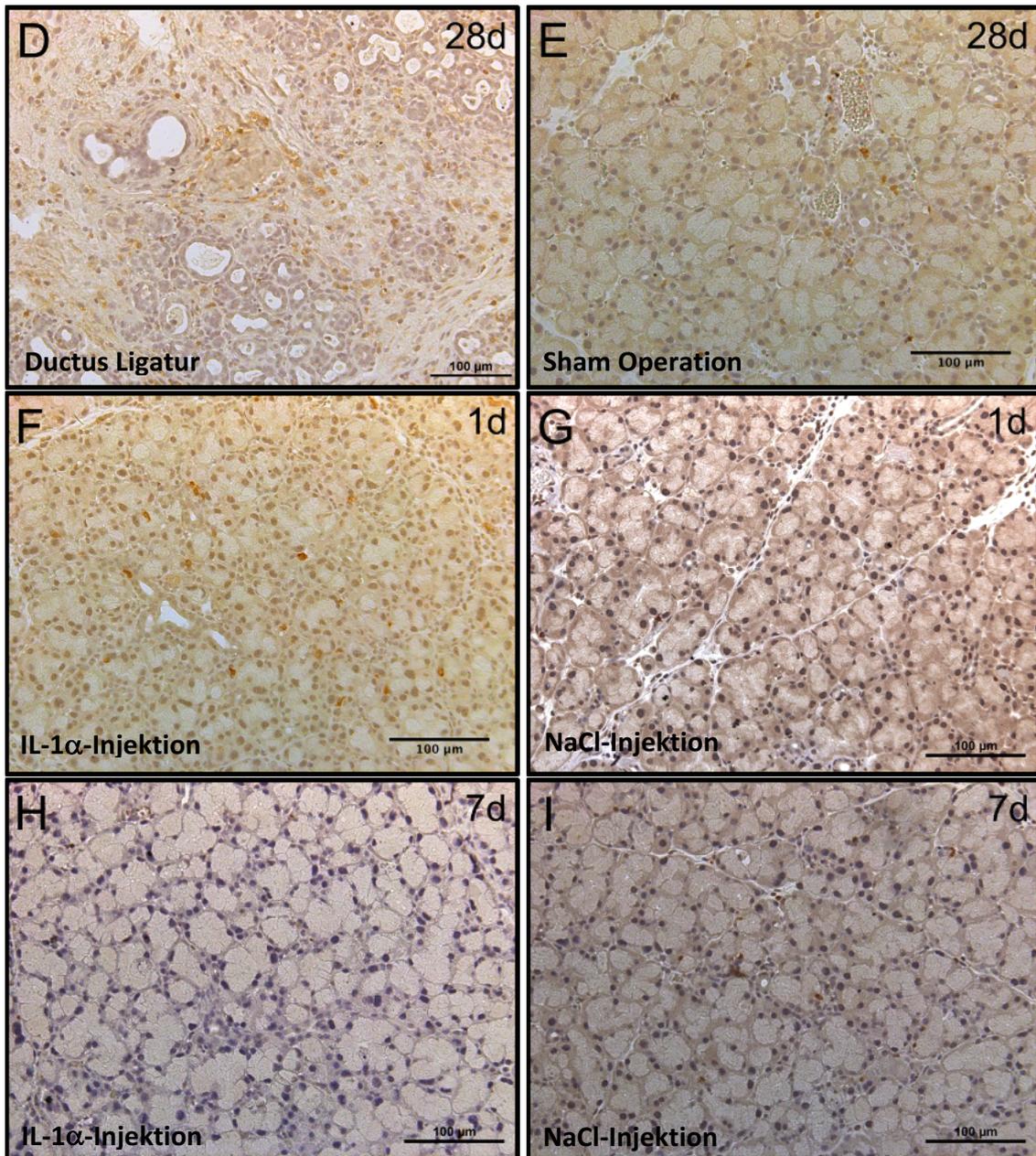


Abb. 19: CD3 Färbung der TD. Bilder A-I zeigen eine unbehandelte Drüse (A) sowie den Vergleich zwischen Drüsen nach DL und Sham Operation (B-E) bzw. nach IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion (F-I). Alle Bilder zeigen eine 200-fach Vergrößerung. Die CD3 positiven Zellen sind im Parenchym der TD zu erkennen (roter Pfeil)

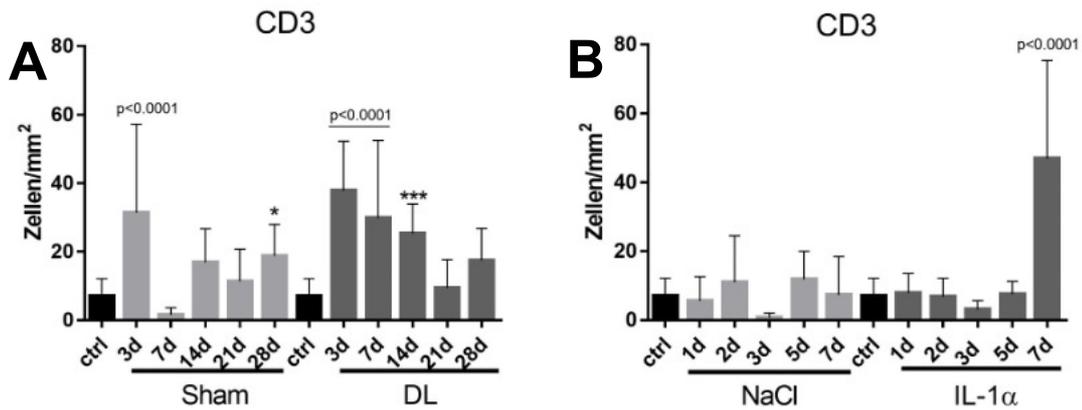


Abb. 20 (Modifiziert aus Publikation¹): Anzahl CD3 positiver Zellen pro mm², nach der DL (A) erreicht diese an den Tagen 3 und 7 ihr Maximum. Ebenso an Tag 3 der Sham Operation (A). Die IL-1 α -Injektion (B) führt nur an Tag 7 zu einem signifikanten Anstieg der CD3 positiven Färbungen, während die NaCl-Injektion (B) zu keinem signifikanten Anstieg führt.

3.3.2 CD68 (Makrophagen)

Ductus Ligatur und Sham Operation

Im Vergleich zu den unbehandelten TD (Kontrolle) ($32.53 \text{ Z/mm}^2 \pm 12.22 \text{ Z/mm}^2$) (Abb. 23) fanden sich nach der DL ab Tag 3 ($343.20 \text{ Z/mm}^2 \pm 98.04 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) ein signifikanter Anstieg der CD68 positiven Zellen (siehe Abb. 21). An Tag 7 ($366.10 \text{ Z/mm}^2 \pm 131.40 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) erreichte die Anzahl der positiven Färbungen ihr Maximum. Anschließend bildete sich ihre Anzahl nach der Eröffnung der DL an Tag 7 zurück, war aber an Tag 28 ($177.60 \text{ Z/mm}^2 \pm 47.14 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$), dem Endzeitpunkt, noch signifikant erhöht. Die Sham Operation führte nur an Tag 3 ($132.00 \text{ Z/mm}^2 \pm 73.39 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) zu einem Anstieg der CD68 positiven Zellen.

IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion

Die Zahl CD68 positiver Zellen stieg an Tag 1 ($194.70 \text{ Z/mm}^2 \pm 62.18 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) und Tag 2 ($185.60 \text{ Z/mm}^2 \pm 39.06 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) nach der IL-1 α -Injektion im Vergleich zur Kontrolle ($32.53 \text{ Z/mm}^2 \pm 12.22 \text{ Z/mm}^2$) an (Abb. 23). Sie erreichte an Tag 3 ($230.10 \text{ Z/mm}^2 \pm 100.40 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) ihr Maximum, wonach Tag 5 nicht mehr signifikant erhöht war, während Tag 7 ($107.50 \text{ Z/mm}^2 \pm 51.46 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) wieder einen Anstieg zeigte. Die NaCl-Injektion führte an Tag 1 ($86.00 \text{ Z/mm}^2 \pm 23.77 \text{ Z/mm}^2$, $p=0.0036$), Tag 2 ($164.40 \text{ Z/mm}^2 \pm 59.50 \text{ Z/mm}^2$, $p<0.0001$) und Tag 5 (114.40

Z/mm² ± 30.06 Z/mm², p<0.0001) zu einem signifikanten Anstieg der CD68 positiven Zellen gegenüber der Kontrolle, dargestellt in Abb. 22.

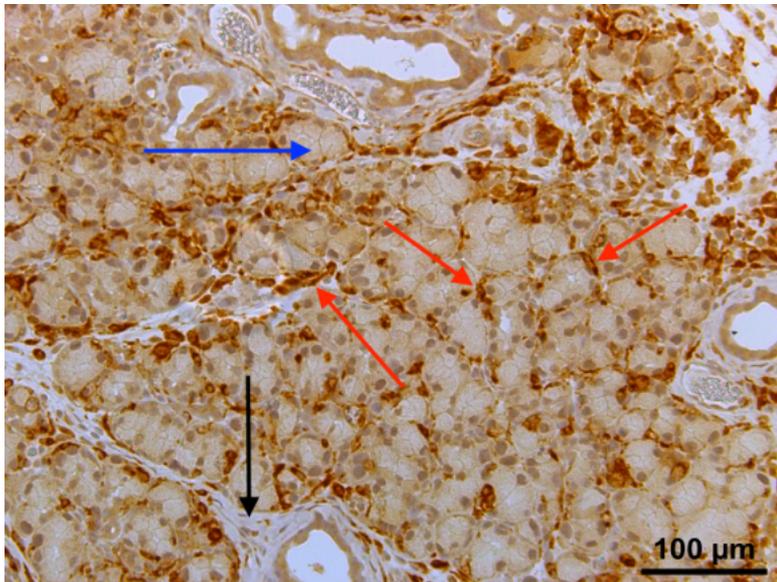
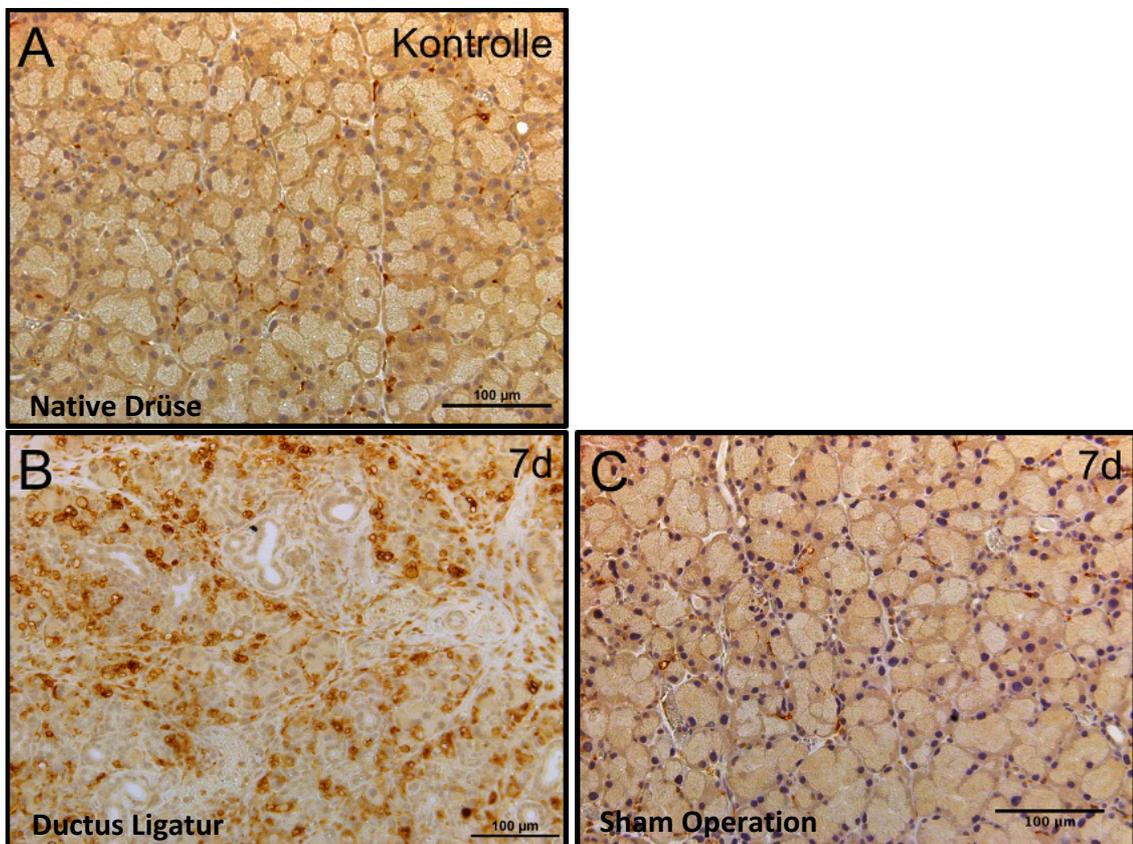


Abb. 21: Beispielbild der immunhistologischen Färbung einer TD. An Tag 3 nach DL in 100-fach Vergrößerung, angefärbt sind CD68 positiven Zellen (roter Pfeil) welche sich im Parenchym zwischen den Azinuszellen (blauer Pfeil) und Bindegewebe befinden (schwarzer Pfeil).



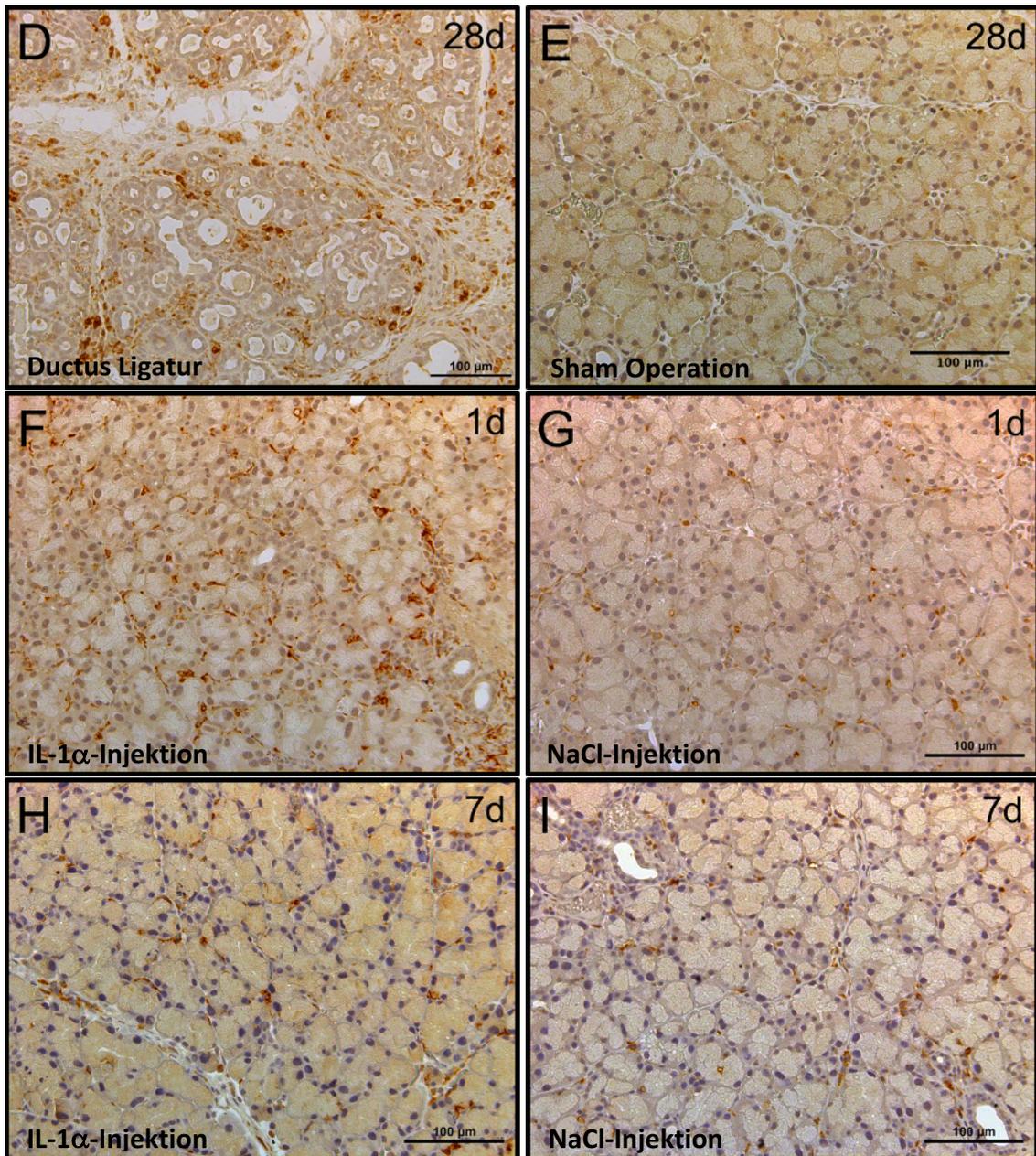


Abb. 22: CD68 Färbung der TD. Bilder A-I zeigen eine unbehandelte Drüse (A) sowie den Vergleich zwischen Drüsen nach DL und Sham Operation (B-E) bzw. nach IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion (F-I). Alle Bilder zeigen eine 200-fach Vergrößerung. Besonders viele CD68 positive Zellen sind an Tag 7 nach DL (B) und Tag 1 nach IL- α -Injektion (F) zu sehen.

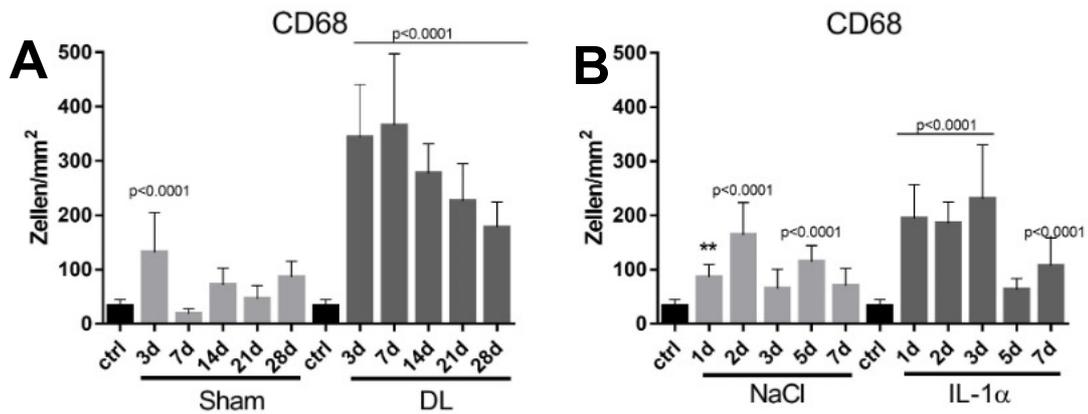


Abb. 23 (Modifiziert aus Publikation¹): Anzahl CD68 positiver Zellen pro mm². Nach der DL (A) kam es zu einem Anstieg der CD68 positiven Zellen ab Tag 3 mit einem Maximum an Tag 7. Wohingegen die Sham Operation nur an Tag 3 einen signifikanten Anstieg zeigte (A). Die IL-1 α -Injektion (B) führte zu einem signifikanten Anstieg an den Tagen 1, 2, 3 und 7 mit einem Maximum an Tag 3. Vergleichend ließ die NaCl-Injektion die Anzahl CD68 positiver Zellen an Tag 1, 2 und 5 signifikant ansteigen.

3.3.3 CD138 (Plasmazellen)

Ductus Ligatur und Sham Operation

In den Kontrollen (1.95 ± 2.01) fanden bereits CD138 positive Zellen (Abb. 26). Nach der DL stieg ihre Anzahl an Tag 3 ($7.05 \text{ Z/mm}^2 \pm 7.34 \text{ Z/mm}^2$, $p < 0.0001$) und Tag 7 ($5.45 \text{ Z/mm}^2 \pm 7.58 \text{ Z/mm}^2$, $p = 0.0078$) (siehe Abb. 24) an. Nach der Eröffnung der DL an Tag 7 war an den weiteren Tagen keine signifikante Steigerung der Anzahl CD138 positiver Zellen zu beobachten. Ebenso an allen Tagen der Sham Operation.

IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion

Weder die Injektion von IL-1 α noch von NaCl führten zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl CD138 positiver Zellen (Abb. 26) gegenüber der Kontrolle ($1.95 \text{ Z/mm}^2 \pm 2.01 \text{ Z/mm}^2$). Erkennbar ist die Färbung in Abb. 25.

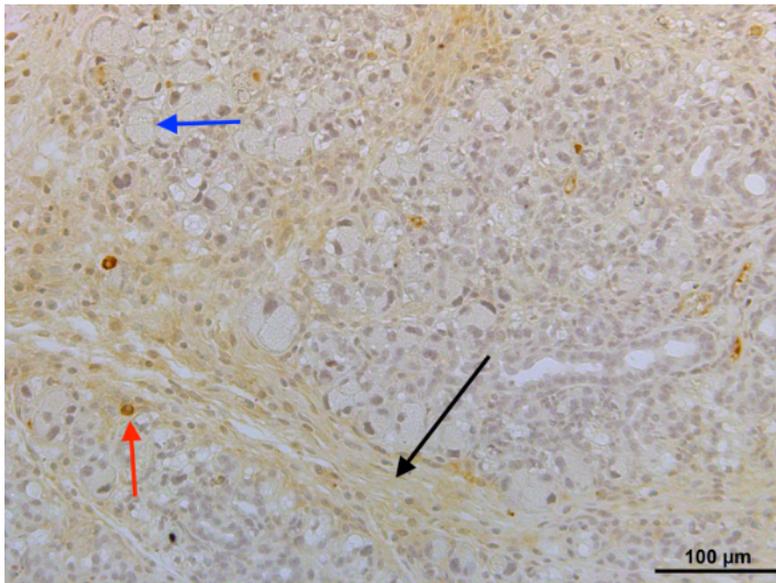
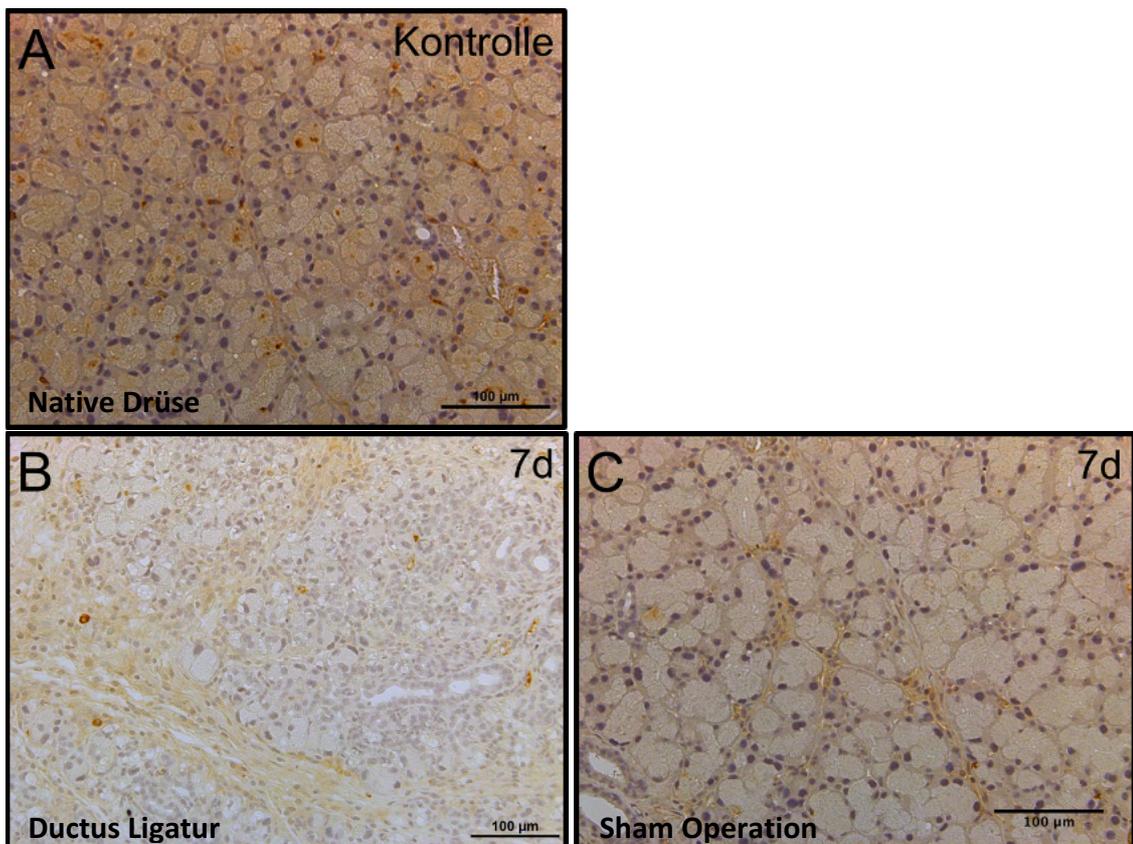


Abb. 24: Beispielbild der Immunhistologischen Färbung einer TD. An Tag 7 nach DL in 100-fach Vergrößerung, angefärbt sind CD138 positive Zellen (roter Pfeil) welche sich im Parenchym zwischen den Azinuszellen (blauer Pfeil) befinden. Zudem ist auf dem Bild Bindegewebe erkennbar (schwarzer Pfeil) in welchem sich ebenfalls CD138 positive Zellen befinden.



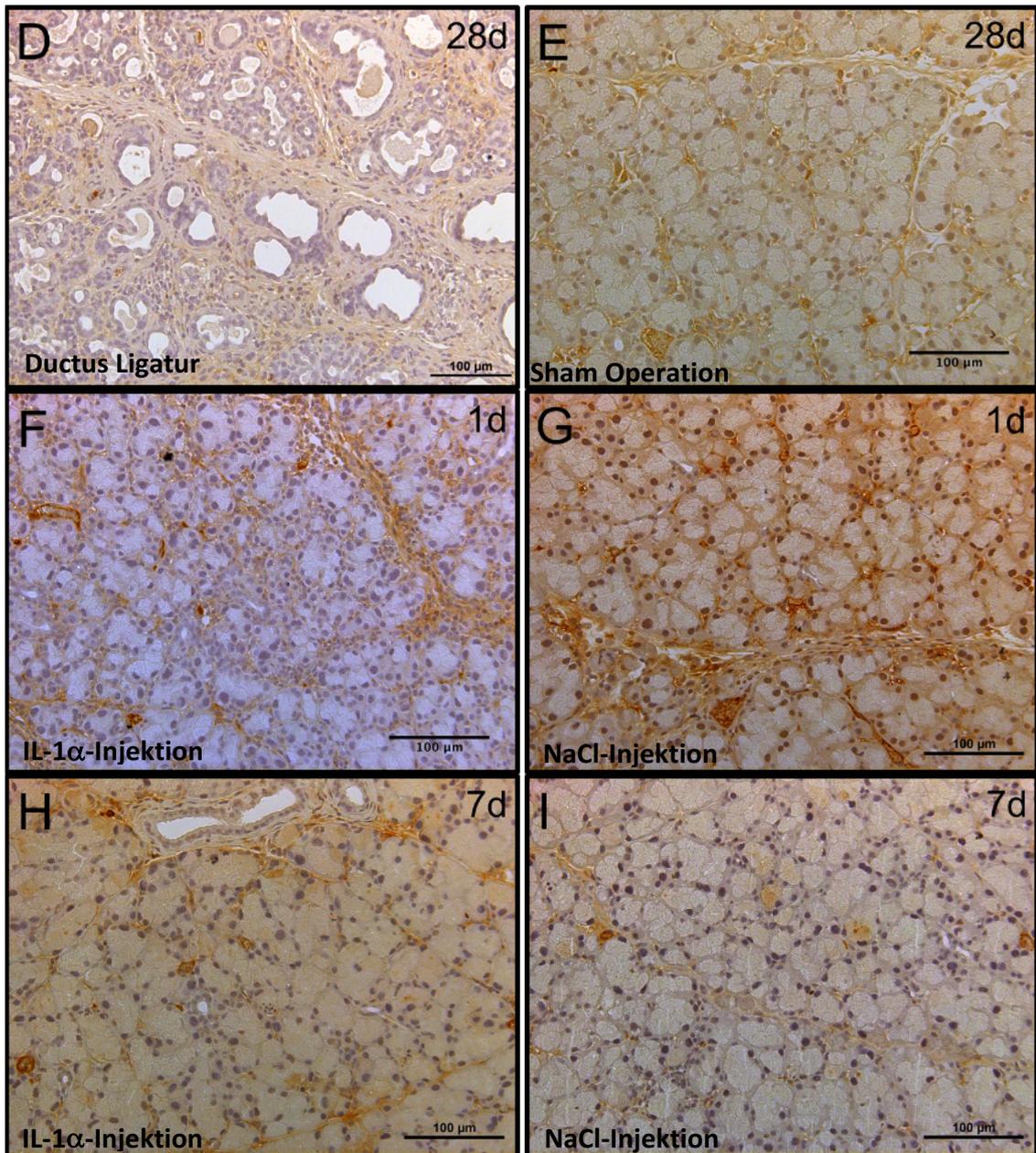


Abb. 25: CD138 Färbung der TD. Bilder A-I zeigen eine unbehandelte Drüse (A) sowie den Vergleich zwischen Drüsen nach DL und Sham Operation (B-E) bzw. nach IL-1 α -Injektion und NaCl-Injektion (F-I). Alle Bilder zeigen eine 200-fach Vergrößerung. Besonders viele CD138 positive Zellen sind an Tag 7 nach DL (B) zu sehen.

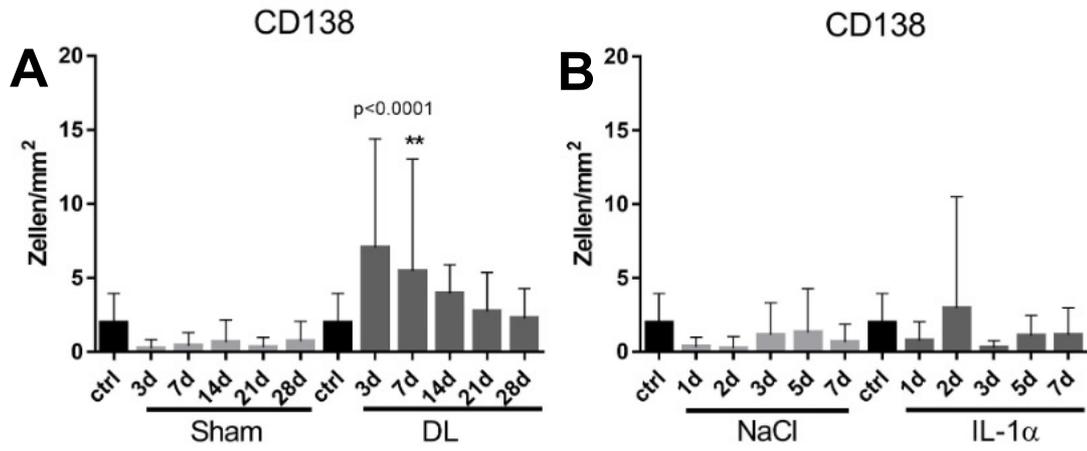


Abb. 26 (Modifiziert aus Publikation¹): Anzahl CD138 positiver Zellen pro mm². Nach der DL (A) steigt die Anzahl CD138 positiver Zellen an Tag 3 und 7 an. Die restlichen Tage, sowie die Sham Operation, IL-1α-Injektion und NaCl-Injektion führen zu keinem signifikanten Anstieg der CD138 positiven Zellen (B).

4. Diskussion

Für das Verständnis des Trockenen Auges und die Erforschung ist es wichtig, die Schädigungs- und Regenerationsprozesse in der TD besser zu verstehen. Es existieren hierfür bereits verschiedene Schädigungsmodelle in der Maus. Beispielsweise die Injektion von IL-1 α in die TD, etabliert durch Zoukhri *et al.*, sowie die permanente Ligatur des Tränenausführungsganges durch Liu *et al.*^{40,46}. Weitere vergleichbare *in vivo* Studien stammen von Lin *et al.* (passagere Ligatur der TD von Kaninchen für 3 Tage), Takahashi *et al.* (passagere DL für 7 Tage an Ratten) und Walker *et al.* (permanente DL an Ratten)^{50,51,52}.

Für die Erforschung neuer Therapieansätze ist es unerlässlich das hierfür am besten geeignete Mausmodell zu evaluieren. Es fehlt bisher eine direkte, vergleichende Evaluation der zugrundeliegenden Entzündungs- und Regenerationsprozesse dieser Mausmodelle. Dies ist jedoch die nötige Grundlage, um deren Nutzbarkeit zur Testung regenerativer Behandlungen bewerten zu können.

In dieser Studie wurden daher die IL-1 α -Injektion und die DL hinsichtlich der Schwere der Schädigung (klinisch wie auch histologisch), der zugrundeliegenden Entzündungsreaktionen und der Fähigkeit zur anschließenden Geweberegeneration direkt miteinander verglichen. Um mögliche Einflüsse des operativen Eingriffes an der TD aufzudecken bzw. nicht in die Auswertung einfließen zu lassen, wurden Sham operierte bzw. NaCl-injizierte Tieren, neben der unbehandelten Kontrolle, als zusätzliche Kontrollgruppen genutzt. An diesen wurde die gesamte operative Prozedur durchgeführt, jedoch erfolgte anstatt der IL-1 α -Injektion eine NaCl Injektion. Die DL wurde hierfür durch ein kurzes Manipulieren des *Ductus lacrimalis* durch die sogenannte Sham-OP ersetzt.

In den bereits veröffentlichten Ergebnissen dieser Studie durch Dietrich *et al.* wurden die notwendigen Eigenschaften eines Schädigungsmodells im Hinblick auf eine Nutzung zur Testung regenerativer Therapien folgendermaßen definiert¹:

- Auftreten von klinischen Zeichen eines Trockenen Auges,
- Reproduzierbarer Schaden des TD Gewebes,
- Möglichkeit einer Regeneration der TD *in vivo*,
- Beurteilbare zeitlichen Abläufe der Schädigung und Regeneration,
- vergleichbarer Mechanismus der Schädigung mit den pathologischen Veränderungen in TD von Patienten mit der Erkrankung eines Trockenen Auges.

Die klinische Diagnose eines Trockenen Auges hängt von einer Kombination aus Anamnese, klinischen Symptomen und diagnostischen Tests ab. Es gibt keinen Test, der für sich alleine genommen verlässlich ein trockenes Auge diagnostizieren kann. Weiterhin besteht bisher kein einheitlicher internationaler Konsens darüber, welche Kombination aus Tests genutzt werden sollten¹⁸. Dies erschwert die Auswahl geeigneter Tests zur Diagnostik eines experimentell induzierten Trockenen Auges im Tiermodell. Zudem ist nicht definiert, welche Bedingungen diese Tests erfüllen müssen, um die experimentelle Induktion eines Trockenen Auges zu bestätigen. Zur Beurteilung im Tiermodell sind z.B. der Schirmer Test, die Anfärbung der Augenoberfläche mit Fluoreszein oder histologische Untersuchungen geeignet, da diese eine direkte Vergleichbarkeit ermöglichen.

Zum Vergleich mit unseren histologischen Untersuchungen diene die physiologische Histologie der Tränendrüse, sie enthält bereits ortsständige Immunzellen im Parenchym⁵³. Dabei handelt es sich zu 53,9 % um Plasmazellen im Interstitium, deren Hauptaufgabe die Synthese von IgA für die sekretorische Abgabe über die Azinus- und Ductuszellen ist⁵⁴. Weiter finden sich zu 40,3 % T-Zellen im Interstitium, dabei handelt es sich hauptsächlich um T-Suppressor und zytotoxische Zellen. In den primären Follikeln finden sich B-Zellen, welche 5,7 % der Immunzellen ausmachen, sie sind durch Antigenpräsentation und Phagozytose beteiligt an der adaptiven Immunabwehr. Gewebsständige Makrophagen sind auch in der gesunden TD vorhanden⁵⁵.

4.1 Interleukin-1 α -Injektion

Nach der Injektion mit IL-1 α kommt es in dieser Studie zu einer direkten, aber passageren Entzündung der TD. Die Injektion von IL-1 α führt zu einem Verlust von Tränendrüsenparenchym und vitalen Azinuszellen in den folgenden zwei Tagen mit anschließender Regeneration. Zeitgleich nehmen interstitielle Ödeme, Fibrose sowie die Infiltration von Immunzellen zu. Bereits ab Tag 3 bildet sich die Entzündungsreaktion zurück. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Zoukhri *et al.* beschrieben⁴⁰.

Durch Di Paolo *et al.* wurde die allgemeine Entzündungsreaktion nach IL-1 α -Injektion beschrieben. Es konnte eine Aktivierung von Makrophagen im entzündeten Gewebe durch die Injektion von IL-1- α nachgewiesen werden⁴⁷. Infolge ihrer Aktivierung schütten die Makrophagen Zytokine wie CXCL1, CXCL2 (*(C-X-C motif) ligand 1/2*) und IL-6 aus, wodurch Myeloische Zellen rekrutiert werden und weitere Zytokine ausschütten. Aufgrund der Entzündungsreaktion wird das Gewebe der TD geschädigt.

Durch den Verlust der Plasmamembran der geschädigten Zellen kommt es zur weiteren, passiven Freisetzung von IL-1 α ⁴⁷. Die abgestorbenen Zellen werden im Anschluss durch Phagozytose beseitigt werden und anschließend ein Regenerationsprozess beginnt. Durch die wachsende Fläche des vitalen Drüsengewebes im Rahmen der Regeneration wird die passive IL-1 α Freisetzung supprimiert und die Entzündungsreaktion retardiert. Dieser Schädigungsmechanismus spiegelte sich auch in unserem *in vivo* Modell der IL- α Injektion wider. Es kam zunächst an Tag 1 zu einem signifikanten Anstieg vor allem von Granulozyten, gemessen durch den Infiltrationsscore nach H&E Färbung. Zeitgleich zeigte sich ein Untergang von vitalen Azinuszellen an Tag 1 und 2 sowie ein Rückgang des TD-Parenchyms. Dieser war begleitet von einer Zunahme interstitieller Ödeme und Fibrose.

Es war kein signifikanter Anstieg an CD3-positiven Zellen (T-Zellen) bis auf Tag 7 zu detektieren. CD3 ist ein Co-Rezeptor, welcher auf T-Lymphozyten exprimiert wird, sowohl auf zytotoxischen T-Zellen als auch auf T-Helfer Zellen²⁵. Der Anstieg der T-Zellen an Tag 7 ist jedoch nicht mit dem Gesamtbild der Entzündung erklärbar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen statistischen Ausreißer, da nur eine von drei untersuchten Drüsen zu einem signifikant erhöhten Wert der Gruppe führte. Dies könnte z.B. durch die geringe N-Zahl (n=3) bedingt sein.

In einer Studie von Williamson *et al.* zur Histologie der TD beim Trockenen Auge, wurde beschrieben, dass vereinzelte CD138 positive Zellen (Plasmazellen) als Teil eines gesunden Tränendrüsensparenchyms vorhanden sind²⁰. Durch Williamson *et al.* wird diskutiert, dass sie keine Plasmazellen in humanen TD mehr identifizieren konnten, nachdem die Infiltration der Lymphozyten im Rahmen eines Sjögren- bzw. Sicca-Syndroms begonnen hatte²⁰. Auch in der aktuellen Studie wurden die Plasmazellen, welche für die Produktion und Sekretion von Antikörpern verantwortlich sind, immunhistologisch untersucht. Insgesamt wurden nur wenige Plasmazellen in der IL-1 α oder NaCl-Gruppe detektiert. Möglicherweise weist dies auf das von Williamson *et al.* beschriebene Phänomen hin²⁰.

Die anschließende Phagozytose zeigt sich durch die Immunfärbung von CD68 positiven Zellen (Makrophagen) diese ist sowohl nach der IL-1 α -Injektion als auch nach NaCl-Injektion gesteigert. Dies könnte in beiden Modellen durch die Druckatrophie der Injektion oder das Trauma der Injektionskanüle erklärbar sein. Nach der IL-1 α -Injektion ist die Zahl der Makrophagen an Tag 1 bis 3 sowie Tag 7 signifikant erhöht. Allerdings

kommt es auch nach der NaCl-Injektion an Tag 1, Tag 2 und Tag 5 zu einer signifikanten Steigerung der Makrophagen.

In Betrachtung des Tränendrüsensparenchyms und der Fläche vitaler Azinuszellen zeigt sich bereits ab Tag 3 nach der IL-1 α -Injektion eine spontane Regeneration. Es kommt schließlich zu einer kompletten Regeneration des Tränendrüsensparenchyms und der Fläche vitaler Azinuszellen ab Tag 3. Dies steht im Gegensatz zur histologischen Auswertung der H&E Färbungen nach IL-1 α -Injektion durch Zoukhri *et al.*. Hier beschrieben die Autoren einen ausgedehnten Gewebeschaden mit Verlust von Azinuszellen, sowie einer Entzündungsreaktion mit einem Höhepunkt zwischen Tag 1 und Tag 7. Anschließend ließen das Ödem, die Entzündungsreaktion und die Zahl der infiltrierenden Immunzellen zwischen Tag 7 und Tag 13 nach. Das histologische Bild war anschließend wieder vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe⁴⁰, in der aktuellen Studie war die Entzündungsreaktion bereits an Tag 2 nicht mehr signifikant erhöht.

In beiden Studien wurde die gleiche Menge und Konzentration von IL-1 α injiziert. Eine mögliche Ursache für die Unterschiede könnte in der Verwendung von rekombinantem humanem IL-1 α in der Studie von Zoukhri *et al.* liegen, während in der aktuellen Studie murines rekombinantes IL-1 α verwendet wurde. Möglicherweise bedingt das murine IL-1 α eine kürzere Entzündungsreaktion mit weniger Gewebeschädigung im Mausmodell. In der Studie von Zoukhri *et al.* waren zudem die weiblichen Tiere 10-12 Wochen alt, während unsere männlichen Tiere 8-10 Wochen alt waren⁴⁰. Unter Umständen sind ein besser ausgeprägtes Immunsystem der älteren Tiere oder bessere Regenerationsmechanismen der jüngeren Tiere für diesen Unterschiede verantwortlich^{56,57}. Möglich wäre auch, dass der Geschlechtsunterschied verantwortlich für die stärkere Entzündung bei den Weibchen ist. Diese Erkenntnis ist aus der Ätiologie des Trockenen Auges bereits bekannt und deckt sich mit den Ergebnissen von Sullivan *et al.*, in denen eine Entzündung der TD bei weiblichen Mäusen durch Androgentherapie verringert werden konnte^{8,15,58}. Dies wird bereits als weiterer Ansatz zur Entwicklung eines Mausmodelles des Trockenen Auges erforscht⁵⁹.

Die immunhistologischen Erkenntnisse der aktuellen Studie decken sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Es konnte z.B. auch durch Hawley *et al.* wie in der aktuellen Studie eine Immunzellinfiltration in die TD nach IL-1 α -Injektion gezeigt werden⁶⁰. Die infiltrierenden Immunzellen konnten durch Hawley *et al.* und in der vorliegenden Studie vor allem als neutrophile Granulozyten identifiziert werden, die Identifizierung erfolgte anhand des segmentierten Zellkerns. Die Immunzellinfiltration

fand sich in der Studie von Hawley *et al.* kurz nach der IL-1 α -Injektion an den Tagen 1 - 3, während sie in der aktuellen Studie nur an Tag 1 nachweisbar war⁶⁰. Ob es sich bei dem durch Hawley *et al.* genutzten IL-1 α um humanes oder murines IL-1 α handelt, wird durch die Autoren nicht angegeben⁶⁰.

Klinisch wurden die Immunprozesse nach IL-1 α -Injektion durch den Schirmer-Test und das *Oxford Grading* untersucht. Der Schirmer-Test konnte in diesem Mausmodell aufgrund einer zu geringen basalen Tränensekretion der Mauslinie nicht ausgewertet werden, hierzu folgt ein eigener Absatz. Das *Oxford Grading* der Fluoreszeinfärbung der Augenoberfläche folgt nach der IL-1 α -Injektion dem bisherigen Muster der Entzündung. Es zeigte sich an Tag 1 und Tag 2 eine Schädigung der kornealen Epithelzellen, welche sich anschließend regenerierte. Allerdings zeigte sich auch an Tag 1 und 3 nach der NaCl-Injektion ein erhöhtes *Oxford Grading*. Die Schäden an Tag 1 nach IL-1 α -Injektion scheinen daher eher durch die Operationen selbst bedingt sein. Hierbei könnte die Applikation von Salbe, welche das Auge vor dem Austrocknen schützen soll, ursächlich sein. Die Tiere pflegen die Augen postoperativ intensiv, um die Salbe zu entfernen. In allen vier Gruppen kommt es zudem an Tag 3 zu einer signifikanten Schädigung der kornealen Epithelzellen, dies ist der klassische Zeitpunkt für Jucken in der Proliferationsphase der Wundheilung⁶¹. Folglich könnte auch eine Reaktion der Tiere, durch die anatomische Nähe zum Operationsgebiet, einen mechanischen Schaden verursacht haben. Ebenso könnte der Schaden durch den perioperativen Stress verursacht sein, da Stress eine bekannte Ursache des Trockenen Auges im Tiermodell ist⁶².

Zoukhri *et al.* konnten zusätzlich zeigen, dass durch die Gabe von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IL-1 α) die neuronal gesteuerte Sekretion der TD inhibiert wird⁶³. Die neuronale Innervation der entzündeten TD war zwar intakt, der Sekretionsmechanismus war jedoch behindert, da kein ACh freigesetzt wurde⁶³. Es ist also davon auszugehen, dass die Entzündungsreaktion nach der IL-1 α -Injektion die parasymphatische Steuerung der TD durch eine verminderte ACh Freisetzung herabsetzt. Auch dieser Mechanismus könnte durch verminderte Tränensekretion zu einer Erhöhung des *Oxford Gradings* geführt haben.

4.2 Ductus Ligatur

Die Ligatur des *Ductus lacrimalis* für 7 Tage führte ab Tag 3 zu einer Entzündung, welche bis Tag 28 persistierte. Dies zeigte sich im Verlust von Tränendrüsenparenchym und vitalen Azinuszellen sowie Zunahme von interstitiellen Ödemen, Fibrose und

Immunzellinfiltration über den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Es war eine spontane Regeneration des Tränendrüsenparenchyms ab Tag 14, 7 Tage nach der Eröffnung der Ligatur zu beobachten. Eine Schädigung der kornealen Epithelzellen war nur an Tag 7 nach DL nachweisbar.

Es ist davon auszugehen, dass die Apoptose nach DL durch die Flüssigkeitsaufstauung im Gewebe und einsetzender Druckatrophie hervorgerufen wird. Dies wird durch die Beobachtung eines signifikanten Anstiegs von Caspase-3 Zellen in der Studie von Dietrich *et al.* gestützt^{1,46,51,52}. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Ergebnissen von Liu *et al.*, die nach der DL einen Anstieg TUNEL-positiver Zellen detektierten⁴⁶.

Durch die Druckatrophie kommt es zu einer Entzündungsreaktion, welche sich durch eine vermehrte Immunzellinfiltration, interstitielles Ödem und Fibrosen zeigt. In Folge der Entzündungsreaktion kommt es wiederum zu einem Umbau des TD-Gewebes und die Gesamtfläche der TD verkleinert sich. Gleichzeitig kommt es zu einem Verlust von vitalem Drüsengewebe und die kornealen Epithelzellen werden begleitend geschädigt. Im Anschluss an diesen Prozess werden die Zellreste durch Phagozytose abgebaut und es beginnt ein Regenerationsprozess. Dieser Ablauf spiegelt sich in unseren Ergebnissen der DL wider, zudem fügen sich die Erkenntnisse gut in das Bild bisheriger Studien mit Ligatur des Ausführungsganges ein^{46,51,52}. Es konnte nach der Ligatur des *Ductus lacrimalis* ebenfalls einen Verlust von Tränendrüsenparenchym nachgewiesen werden, wie z.B. bei dem Mausmodell von Liu *et al.* und dem Kaninchenmodell von Lin *et al.*^{46,50}. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Ratten nach Schädigung der Speicheldrüse durch Takahashi *et al.* sowie Walker *et al.* beobachtet^{51,52}.

In der Studie von Liu *et al.* wurden wie in der vorliegenden Studie, die H&E-Färbung der Azinuszellen und die infiltrierenden Entzündungszellen beurteilt. Es zeigte sich bei Liu *et al.* eine starke Entzündung mit Infiltration von Immunzellen an Tag 3 postoperativ, gleichzeitig nahm die Zahl der vitalen Azinuszellen signifikant ab⁴⁶. Diese Ergebnisse zeigten sich analog auch in der vorliegenden Studie. Zudem wurde an Tag 7 ein Minimum an Azinuszellen beschrieben, sowohl bei Liu *et al.* als auch in den vorliegenden Ergebnissen⁴⁶.

Mit Beginn des Regenerationsprozesses ab Tag 14 weichen die von Liu *et al.* erzielten Ergebnisse nach DL von der aktuellen Studie ab⁴⁶. Liu *et al.* beschrieben eine fast vollständige Abwesenheit von Azinuszellen. Im Vergleich dazu konnte in der vorliegenden Studie, nach der Eröffnung der DL, im zeitlichen Verlauf eine Rückkehr der Azinusstrukturen und eine Reduktion der Entzündung beobachtet werden. Dieser

Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch Liu *et al.* die DL vor Entnahme der Drüsen an Tag 3, 7 und 14 nicht eröffnet wurde⁴⁶. Dadurch gab es bei Liu *et al.* keine Regenerationsphase der TD vor deren Entnahme, während in der aktuellen Studie zum Entnahmezeitpunkt der TD an Tag 14 bereits 7 Tage zur möglichen Regeneration der TD vergangen waren⁴⁶. Zudem nutzten Liu *et al.* als Kontrolldrüse die linke Drüse des behandelten Tieres⁴⁶. Allerdings neigen die unbehandelten, kontralateralen Drüsen zur kompensatorischen Hypertrophie durch Zunahme von Ductus- und Azinuszellen⁵². Sie stellen daher möglicherweise keine geeignete Kontrolle für Schädigungsmodelle der TD dar. Bei den Kaninchen von Lin *et al.* wurde die DL nach 30 Tagen wieder eröffnet, als Kontrolle dienten die TD unbehandelte Tiere⁵⁰. Hierdurch ist hinsichtlich der Kontrollen ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen möglich. Es zeigt sich, dass sich bei Lin *et al.* die Größe der Drüse bis Tag 7 nach Eröffnung der DL verringert, gefolgt von einer einsetzenden Regeneration⁵⁰. Zeitgleich kommt es zu einer verminderten Tränensekretion und der Proliferation von gangartigen Strukturen⁵⁰. Die Tränensekretion lässt sich aufgrund unseres nicht auswertbaren Schirmer-Tests nicht vergleichen, es kam jedoch ab Tag 7 nach DL in der aktuellen Studie ebenfalls zur Ausbildung gangartiger Strukturen. Im Anschluss an die DL durch Lin *et al.* reduzierte sich das Gewicht der Drüsen bis Tag 7 und Tag 10 nach Eröffnung der DL auf ca. 50 %⁵⁰. Dies ist nahezu identisch mit der von uns beobachteten Abnahme des Parenchyms an Tag 7 und Tag 14, allerdings scheint die Verkleinerung der Drüse nach Ligatur bei Lin *et al.* länger anzuhalten. Während in der aktuellen Studie die Größenzunahme der TD 7 Tage nach Eröffnung der DL (Tag 14) einsetzt, dauert es bei Lin *et al.* 20 Tage bis zur Regeneration. Allerdings hält der Gewebeverlust in der aktuellen Studie über den gesamten Untersuchungszeitraum an, vergleichend ist bei Lin *et al.* die TD nach 30 Tagen nach Eröffnung wieder zur Kontrollgröße zurückgekehrt. Dieser Unterschied kann auf den kürzeren Beobachtungszeitraum in der aktuellen Studie zurückzuführen sein. Unterschiede in den Ergebnissen beider Studien können auch durch die verschiedenen Spezies begründet sein, da die Geweberegeneration bei Kaninchen und Mäusen nicht identisch verläuft und die Gesamtgröße der Drüsen massiv unterschiedlich ist⁶⁴.

Durch Takahashi *et al.* wurden die DL an Rattenspeicheldrüsen nach 7 Tagen entfernt⁵¹. Es zeigte sich eine komplette Abwesenheit von Azinuszellen an Tag 1 und erst an Tag 3 nach Eröffnung waren erste Azinuszellen erkennbar, das Drüsengewebe war zudem von fibrotischen Strängen durchzogen. Die Azinuszellen näherten sich ab Tag 5 den Kontrollen an, es dauerte noch bis Tag 10, bis kein Unterschied mehr zur Kontrolle

erkennbar war. Dieses Schädigungsmuster ist vergleichbar mit der aktuellen Studie, die Azinuszellen waren hier an Tag 7 nahezu inapparent. Ebenso waren ab Tag 3 ausgeprägte Fibrosen in der TD erkennbar, diese waren bis Tag 21 präsent. Die Azinuszellen waren bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt in der aktuellen Studie deutlich vermindert. Das Gewicht der Speicheldrüsen bei Takahashi *et al.* war nur bis Tag 7 nach Eröffnung der DL reduziert, in der aktuellen Studie ist die Größe der TD bis einschließlich des letzten Untersuchungszeitpunktes an Tag 28 reduziert. Diese Unterschiede können auf die unterschiedlichen Drüsengewebe und Spezies zurückzuführen sein.

Die Veränderung der Drüsenstruktur durch Ligatur konnte bereits durch Walker *et al.* an Rattenspeicheldrüsen gezeigt werden⁵². Sie beobachteten nach der Ligatur einen Untergang der sekretorischen Azinuszellen durch Apoptose innerhalb von 5 Tagen nach der Ligatur. Anschließend kam es nach 4 Wochen zum Untergang der Schaltstücke bis nur noch die Streifenstücke des Ausführungsganges verblieben, welche durch Bindegewebe separiert waren⁵². Ähnliche Ergebnisse wurden durch Takahashi *et al.* ebenfalls an Speicheldrüsen von Ratten erzielt⁵¹. An TD konnten, wie eben geschildert, ähnliche Ergebnisse in der aktuellen Studie sowie durch Lin *et al.* gezeigt werden.

Analog zu der IL-1 α -Injektion wurden bei der DL die beteiligten Immunzellen näher untersucht, um einen tieferen Einblick in die vorliegenden Entzündungsprozesse zu erhalten und beide Modelle vergleichen zu können.

In den Auswertungen nach DL in der aktuellen Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg von T-Zellen, der im Verlauf nach Eröffnung der Ligatur progressiv abnahm. Der Anstieg T-Zellen ist durch die Entzündungsreaktion nach der durch die DL verursachte Apoptose erklärbar. Durch Matsumoto *et al.* konnte gezeigt werden, dass T-Zellen bei Patienten mit durch Sjögren-Syndrom verursachtem DED prominent exprimiert werden⁶⁵. Sie beschrieben eine Infiltration von T-Zellen in die TD von Patienten mit Sjögren Syndrom. Die nachgewiesene, erhöhte Präsenz von T-Zellen im untersuchten Tiermodell legt somit nahe, dass dieses Modell in den klinischen Parametern denen einer chronischer Entzündungen der TD ähnlich ist.

Die Zahl der Plasmazellen erhöhte sich signifikant an den Tagen 3 und 7 nach DL, analog konnte bereits an anderen Mausmodellen des Trockenen Auges durch Li *et al.* eine Zunahme von B-Zellen nachgewiesen werden⁶⁶. In der aktuellen Studie wurden die Plasmazellen unmittelbar nach der DL nachgewiesen, was auf eine direkte Beteiligung an der vorliegenden Entzündungsreaktion schließen lässt. Es bleibt offen, warum die Plasmazellen nach der DL vermehrt nachweisbar sind während nach der IL-1 α -Injektion

keine Zunahme im Gewebe zu beobachten war. Möglicherweise weist die vermehrte Anwesenheit der Plasmazellen auf eine Fremdkörperreaktion hin, denn an den Tagen 3 und 7 lag die DL an das TD-Gewebe an. Folglich könnte die Abwesenheit der Plasmazellen ab Tag 14 nach DL auch auf das von Williamson *et al.* beschriebene Phänomen im Rahmen einer chronische Entzündung hinweisen²⁰.

Die Phagozytose durch Makrophagen war ebenfalls in der Immunhistologie nachweisbar. In den Experimenten der aktuellen Studie zeigte sich nach der DL ein Maximum der Infiltration von Makrophagen an Tag 7. Alle weiteren untersuchten Zeitpunkte nach DL wiesen ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen auf, während sich nach der Sham-Operation nur an Tag 3 eine signifikante Erhöhung der Makrophagenanzahl zeigte. Die Phagozytose im Rahmen einer Entzündungsreaktion lässt sich gut mit dem histologischen Gesamtbild aus der Messung der Gesamtdrüsenfläche und vitaler Azinuszellen assoziieren. Denn an Tag 7 nach DL finden sich die geringste Gesamtdrüsenfläche und vitalen Azinuszellen zeitgleich mit dem Maximalwert der Makrophagen. Dies könnte auf eine Phagozytose der Zellreste untergegangener Azinuszellen hindeuten. Gestützt wird dies dadurch, dass sich nach der Sham-Operation nur an Tag 3 eine erhöhte Makrophagen-Präsenz nachweisen ließ. Der Schaden der Operation ohne DL verursachte auch hier einen Zellverlust, welcher jedoch minimal war und nicht anhielt.

Die klinische Abbildung der Entzündungsreaktion war erschwert, denn der durchgeführte Schirmer-Test konnte nicht ausgewertet werden. Diese Problematik wird in einem folgenden Absatz behandelt. Es verblieb das *Oxford Grading* als zweiter klinischer Parameter, dieses war nach DL an Tag 3 und Tag 7 erhöht, allerdings stieg es auch an Tag 3 nach der Sham Operation signifikant an. Der Schaden des kornealen Epithels nach DL an Tag 3 und Tag 7 deckt sich mit dem Vorhandensein der DL, er kann daher durch einen Mangel an Tränenflüssigkeit hervorgerufen sein. Wobei das gesteigerte *Oxford Grading* an Tag 3 nach DL und Sham, wie nach der IL-1 α -Injektion, auch durch eine intensivierete Pflege der Tiere postoperativ erklärt werden kann. Zusammenfassend fügen sich die Ergebnisse zur DL der aktuellen Studie gut in die bisherigen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Entwicklung eines Mausmodells mit trockenem Auge ein.

4.3 Vergleich der Entzündungsreaktion beider Modelle

Da es sich beim DED um eine chronische Entzündungsreaktion handelt, ist es wichtig die Ergebnisse dieser Studie im Vergleich zwischen akuter und chronischer

Entzündungsreaktion zu betrachten. Im Rahmen chronischer Entzündungen setzt sich die Vasodilatation der akuten Entzündung fort, wodurch vermehrt Neutrophile in das Gewebe infiltrieren. Allerdings werden die kurzlebigen Neutrophilen im Verlauf der chronifizierenden Entzündungsreaktion durch Makrophagen und Lymphozyten ersetzt. Der Beginn der chronischen Entzündungskreation ist daher histologisch an der Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen erkennbar. Durch das Ausschütten von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, tragen sie zur Persistenz der Entzündungsreaktion und Fibrose des Parenchyms bei. Durch eine chronische Entzündungsreaktion wird zudem die Wundheilung verzögert.^{67,68,69,70}

Im Vergleich der beiden Schädigungsmodelle erfüllt die DL die Eigenschaften einer chronischen Entzündung besser als die IL-1 α -Injektion. Die Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen erbrachte den Nachweis von vermehrten Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen nach der DL. Dem gegenüber stehen lediglich erhöhte Makrophagen nach der IL-1 α -Injektion. Welche jedoch nach der IL-1 α -Injektion im Vergleich mit der DL-Gruppe in geringerer Zahl in das Gewebe infiltrieren. Dies kann auf dem größeren Gewebeschaden beruhen, welcher nachweislich durch die DL hervorgerufen wird. Auch klinisch lassen sich diese Ergebnisse gut einordnen, denn bei Patienten mit Sjögren-Syndrom korreliert die Anzahl der Makrophagen in den kleinen Speicheldrüsen mit dem Grad der Entzündung⁷¹.

Korrelierend dazu persistierte die Reduzierung der Azinuszellen nach DL, während sich die Azinuszellen nach IL-1 α -Injektion ab Tag 3 vollständig regenerierten. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Fläche vitaler Azinuszellen zwischen Tag 7 nach IL-1 α -Injektion und Tag 28 nach DL. Zeitgleich regenerierte sich die Fläche des TD-Parenchyms nach IL-1 α -Injektion komplett und nach DL nahezu komplett. Dieser Unterschied kann ein Hinweis auf eine fibrotische Veränderung der TD nach DL sein, dies zeigte sich auch in unseren histologischen Untersuchungen. Bis Tag 14 (7 Tage nach Eröffnung der DL) war ein starkes interstitielles Ödem, Fibrose, Immunzellinfiltration und ein deutlicher Verlust der Azinusstruktur erkennbar. Ein Rückgang dieser Entzündungszeichen war erst ab Tag 21 nach DL erkennbar. Diese Hinweise lassen auf eine chronische Entzündungsreaktion nach DL schließen. Eine solche fügt sich gut in die klinischen Erkenntnisse zum DED ein, die chronische Entzündung wurde bereits als Genese von Obstruktionen der Ausführungsgänge und daraus resultierendem DED postuliert⁷².

Durch die IL-1 α -Injektion scheint es zu einer akuten Entzündungsreaktion zu kommen, da außer den Makrophagen keine Immunzellen einer chronischen Entzündung präsent sind. Die Veränderungen des TD-Parenchyms sind zudem transient und es scheint kein fibrotischer Umbau statt zu finden.

Auch Hinsichtlich der von Dietrich *et al.* definierten notwendigen Eigenschaften eines Schädigungsmodells, liegt die DL näher an der Klinik der chronischen Erkrankung des Trockenen Auges als die IL-1 α -Injektion¹. Die klinischen Zeichen des DED sind in beiden Modellen nur an einem Zeitpunkt erhöht. Reproduzierbar ist die Schädigung in beiden Schädigungsmodellen, genauso ist die Regeneration der TD in beiden Modellen gegeben. Sie dauert jedoch nach der DL deutlich länger an als nach der IL-1 α -Injektion. Zudem ist die TD auch nach der deutlich längeren Regenerationsphase von 28 Tagen nach DL nicht komplett regeneriert, während nach IL-1 α -Injektion bereits nach 3 Tagen kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle besteht. Diese deutlich verlängerte und inkomplette Regeneration nach DL bietet den Vorteil, dass sich die Regeneration durch mögliche Therapieansätze besser darstellt und sich die pathologischen Prozesse in dem längeren Untersuchungsintervall besser erforschen lassen. Zudem bildet die DL als Modell mit chronischer Entzündung der TD das DED im Tiermodell besser ab. Der Pathomechanismus nach der DL ist zudem vergleichbar mit dem von Patienten mit einem DED^{65,71}.

Aus diesen Gründen erscheint die DL als das bessere Modell zur Erforschung der Dynamik der Schädigung und Regeneration und damit als Grundlage für die Entwicklung neuer regenerativer Therapien des Trockenen Auges. Die Schädigung durch IL-1 α findet ihren Platz eher bei der Untersuchung von akuten Entzündungsprozessen der TD.

4.4 Schirmer Test

Der Schirmer Test wurde sowohl von Zoukhri *et al.* als von Liu *et al.* zur Messung des Tränenflusses angewendet^{40,46}. Der Test wurde mittels phenolrot-imprägnierter Wollfäden (*Cotton Threads*) durchgeführt. Die Messung wurde sowohl vor der Induktion des Trockenen Auges als auch nach der jeweiligen Schädigung implementiert. Es zeigte sich in unserer Studie, dass bereits die basale Tränensekretion nicht messbar war. Der angefärbte Bereich des Wollfadens spiegelte lediglich den Bereich wider, welcher sich im Augenlid befand. Aufgrund der nicht messbaren Tränensekretion konnten für den Schirmer Test keine Ergebnisse generiert werden. Gegensätzlich zu unseren Versuchen konnten Zoukhri *et al.* eine basale Tränensekretion in beiden (weiblichen) Mausstämmen

messen und auch nach experimenteller Schädigung durch IL1- α einen Zusammenhang zwischen Experiment und Tränensekretion bestimmen⁴⁰. Hier zeigte sich nach IL-1 α Injektion eine transiente Abnahme der Tränensekretion mit Regeneration nach 7 Tagen (BALB/c) bzw. 13 Tagen (C57BL6/J). Die durch Liu *et al.* an männlichen C57BL/6Jc1 Mäusen gemessene Tränenproduktion zeigte ein anderes Muster, hier ließ die Tränensekretion nach der Schädigung durch die DL an allen weiteren Tagen nach und blieb bis zum Ende des Versuches an Tag 14 vermindert.

Gründe für die unterschiedlichen Resultate könnten zum einen das unterschiedliche Mausgeschlecht sein, da Zoukhri *et al.* weibliche C57BL6/J verwendet, wohingegen in der aktuellen Studie männliche Tiere verwendet wurden. Darüber hinaus könnte die Wahl der Wollfäden eine Rolle spielen. In unserer Studie wurden die Fäden von Tianjin Jingming NewTechnological Development Co. Ltd verwendet, wohingegen Liu *et al.* und Zoukhri *et al.* Fäden von Zone quick, FCI ophthalmics verwendeten.

5. Ausblick

Die Erkenntnisse dieser Arbeit liefern einen Beitrag zum Verständnis des DED. Durch die Nutzung eines passenden Schädigungsmodells, können potentielle neue Therapieoptionen für Patienten mit dem Syndrom des schweren Trockenen Auges umfassend erforscht werden und neuartige Therapieoptionen zur kurativen Behandlung untersucht werden.

Die Regeneration der TD nach einer Schädigung scheint möglich. Zudem wurden durch Zoukhri *et al.* und Dietrich *et al.* nach Schädigung der TD Mesenchymale Stammzellen in der TD nachgewiesen^{1,40}. Die Entzündungsreaktion spielt mutmaßlich eine entscheidende Rolle bei der Regeneration, da eine Verbindung zwischen der Schwere des Gewebeschadens und der Menge an MSC nachgewiesen werden konnte¹.

Die Aktivierung und Rekrutierung von MSC erfolgt durch das Ausschütten von Zytokinen aus Immunzellen⁶. Diese Aktivierung führt zur Produktion von immunregulatorischen und trophischen Faktoren durch die MSC. Die Entzündung des Gewebes ist also eine Voraussetzung für die MSC-bedingte Regeneration. Je nachdem ob es sich um eine akute oder chronische Entzündung handelt, unterstützen die MSC eher die Regeneration des geschädigten Gewebes oder erhalten eine chronische Entzündungsreaktion aufrecht. Letzteres führt letztlich zu einem fibrotischen Umbau des Gewebes⁶. Die Wahl eines Mausmodelles mit passender Entzündungsreaktion spielt also eine wichtige Rolle für die weitere Forschung zur MSC unterstützten Regeneration. Die neuen Erkenntnisse über die Rolle der MSC bietet eine vielversprechende Therapieoption zur Regeneration des funktionellen Restgewebes der TD.

Die MSC sind durch ihre fehlende Antigen-Präsentierung gut für eine allogene Transplantation geeignet und zeigten in weiteren Studien bereits Erfolge in der Regeneration der TD^{35,73}.

Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Dietrich J, Schlegel C, Roth M, et al. Comparative analysis on the dynamic of lacrimal gland damage and regeneration after Interleukin-1 α or duct ligation induced dry eye disease in mice. *Exp Eye Res.* 2018;172(March):66-77. doi:10.1016/j.exer.2018.03.026
2. Edman M, Marchelletta R, Hamm-Alvarez S. Lacrimal Gland Overview. In: *Encyclopedia of the Eye.* ; 2010:522-527.
3. Venable JH, Grafflin AL. Gross Anatomy of the Orbital Glands in the Albino Rat. *Am Soc Mammal.* 1940;21(1):66-71. doi:10.1644/870.1.Key
4. L. Drake R, Vogl AW, W. M. Mitchell A, Tibbitts RM, Richardson PE. *Gray's Atlas of Anatomy.* 1st ed. Elsevier Inc.; 2008.
5. Dartt DA. Neural Regulation of Lacrimal Gland Secretory Processes: Relevance in Dry Eye Diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2009;3(28(3)):155-177. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid
6. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 2012;33(3):136-143. doi:10.1016/j.it.2011.11.004
7. Lang GK. *Augenheilkunde.* 6. Stuttgart: Thieme; 2019. doi:10.1055/b-006-163269
8. Sullivan DA, Edwards JA. Androgen stimulation of lacrimal Gland function in Mouse Models of Sjögren ' s Syndrome. 1997;60(3):237-245.
9. Mircheff AK, Warren D, Schechter JE. Lacrimal Gland Hormone Regulation. In: *Encyclopedia of the Eye.* ; 2010:513-521.
10. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res.* 2006;82(5):885-898. doi:10.1016/j.exer.2005.10.018
11. Butovich IA, Lu H, McMahon A, et al. Biophysical and morphological evaluation of human normal and dry eye meibum using hot stage polarized light microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;55(1):87-101. doi:10.1167/iovs.13-13355
12. Lakshmi Prabha J. Tear secretion - A short review. *J Pharm Sci Res.* 2014;6(3):155-157.
13. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. The Ocular Surface TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017;15:276-283. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008
14. Lemp MA. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. *Ocul Surf.* 2007;5(April):75-92. doi:10.1007/978-3-662-44106-0_1
15. Baudouin C. The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(SUPPL. 2). doi:10.1016/S0039-6257(00)00200-9
16. Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, Liu JH, Chou P, Hsu WM. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: The Shihpai eye study. *Ophthalmology.* 2003;110(6):1096-1101. doi:10.1016/S0161-6420(03)00262-8
17. DEWS Epidemiology The Epidemiology of Dry Eye Disease : *Ocul Surf.* 2007;5(2):93-107. doi:10.1016/S1542-0124(12)70082-4
18. Subcommittee. The Epidemiology of Dry Eye Disease: Report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):93-107. doi:10.1016/S1542-0124(12)70082-4
19. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22(7):640-650. doi:10.1097/00003226-200310000-00008
20. Williamson J, Gibson AA, Wilson T, Forrester J V, Whaley K, Dick WC. Histology of the lacrimal gland in keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol.* 1973;57(11):852-858. doi:10.1136/bjo.57.11.852
21. Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: An immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(1):90-100. doi:10.1001/archophthalmol.2011.364
22. Horn F. *Biochemie Des Menschen.* Thieme; 2018. doi:10.1055/b-006-160377
23. Feghali CA, Ph D, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:12-26.
24. Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R. *Duale Reihe: Biochemie.* Thieme; 2016. doi:10.1055/b-003-129341
25. Blum HE, Müller-Wieland D. *Klinische Pathophysiologie.*; 2020. doi:10.1055/b-0040-178462
26. Udo Kellner, Sven Olaf Frahm, Christian Mawrin MK. *Kurzlehrbuch Pathologie.* 3. Thieme; 2019. doi:10.1055/b-007-167433
27. Geerling G. Transplantation der autologen Glandula submandibularis bei schwerster Keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmologie.* 1998;95:257-265.
28. Borrelli M, Schröder C, Dart JKG, et al. Long-term follow-up after submandibular gland transplantation in severe dry eyes secondary to cicatrizing conjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 2010;150(6):894-904. doi:10.1016/j.ajo.2010.05.010
29. Qin J, Zhang L, Cai Z, et al. Microvascular autologous transplantation of partial submandibular

- gland for severe keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(9):1123-1128. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303280
30. Geerling G, Honnicke K, Schröder C, et al. Quality of salivary tears following antologous submandibular gland transplantation for severe dry eye. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000;238(1):45-52. doi:10.1007/s004170050008
 31. Massie I, Dietrich J, Roth M, Geerling G, Mertsch S, Schrader S. Development of Causative Treatment Strategies for Lacrimal Gland Insufficiency by Tissue Engineering and Cell Therapy. Part 2: Reconstruction of Lacrimal Gland Tissue: What Has Been Achieved So Far and What Are the Remaining Challenges? *Curr Eye Res*. 2016. doi:10.3109/02713683.2016.1151531
 32. Dietrich J, Massie I, Roth M, Geerling G, Mertsch S, Schrader S. Development of Causative Treatment Strategies for Lacrimal Gland Insufficiency by Tissue Engineering and Cell Therapy. Part 1: Regeneration of Lacrimal Gland Tissue: Can We Stimulate Lacrimal Gland Renewal In Vivo? *Curr Eye Res*. 2016;3683(August):1-12. doi:10.3109/02713683.2016.1148741
 33. DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1-9. doi:10.3389/fimmu.2013.00201
 34. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/5173732
 35. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9
 36. You S, Kublin CL, Avidan O, Miyasaki D, Zoukhri D. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2087-2094. doi:10.1167/iovs.10-5686
 37. Dietrich J, Roth M, König S, Geerling G, Mertsch S, Schrader S. Analysis of lacrimal gland derived mesenchymal stem cell secretome and its impact on epithelial cell survival. *Stem Cell Res*. 2019;38(May):101477. doi:10.1016/j.scr.2019.101477
 38. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Transfus Med Hemotherapy*. 2008;35(3):194-204. doi:10.1159/000128968
 39. Lai P, Weng J, Guo L, Chen X, Du X. Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomark Res*. 2019;7(1):1-10. doi:10.1186/s40364-019-0156-0
 40. Zoukhri D, Macari E, Kublin CL. A single injection of interleukin-1 induces reversible aqueous-tear deficiency, lacrimal gland inflammation, and acinar and ductal cell proliferation. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):894-904. doi:10.1016/j.exer.2007.01.015
 41. Khalili S, Liu Y, Kornete M, et al. Mesenchymal stromal cells improve salivary function and reduce lymphocytic infiltrates in mice with Sjögren's-like disease. *PLoS One*. 2012;7(6):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0038615
 42. Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. 2015;120(15):3142-3152. doi:10.1182/blood-2011-11-391144.
 43. Jeong J, Baek H, Kim Y-J, et al. Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands. *Exp Mol Med*. 2013;45(11):e58. doi:10.1038/emmm.2013.121
 44. Selvam S, Thomas PB, Hamm-Alvarez SF, et al. Current status of gene delivery and gene therapy in lacrimal gland using viral vectors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(11):1243-1257. doi:10.1016/j.addr.2006.07.021
 45. Barabino S, Schrader S, Mircheff AK, Geerling G. Animal models of dry eye. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2005;80(12):693-696. doi:10.1159/000131097
 46. Liu Y, Hirayama M, Kawakita T, Tsubota K. A Ligation of the Lacrimal Excretory Duct in Mouse Induces Lacrimal Gland Inflammation with Proliferative Cells. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1-9. doi:10.1155/2017/4923426
 47. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol*. 2016;17(8):906-913. doi:10.1038/ni.3503
 48. Zoukhri D, Fix A, Alroy J, Kublin CL. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4399-4406. doi:10.1167/iovs.08-1730
 49. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: An open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji
 50. Lin H, Liu Y, He H, Botsford B, Yiu S. Lacrimal Gland Repair after Short- term Obstruction of Excretory Duct in Rabbits. *Sci Rep*. 2017;(July):1-11. doi:10.1038/s41598-017-08197-2
 51. Takahashi S, Schoch E, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int J Exp Pathol*. 1998;79(5):293-301. doi:10.1046/j.1365-2613.1998.710405.x
 52. Walker NI, Gobé GC. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland

- induced by duct obstruction. *J Pathol.* 1987;153(4):333-344.
papers2://publication/doi/10.1002/path.1711530407.
53. Wieczorek R, Jakobiec FA, Sacks EH, Knowles DM. The Immunoarchitecture of the Normal Human Lacrimal Gland: Relevancy for Understanding Pathologic Conditions. *Ophthalmology.* 1988;95(1):100-109. doi:10.1016/S0161-6420(88)33228-8
 54. Bron AJ, Paiva CS De, Chauhan SK, Bonini S. DEWS II-Pathophysiologybericht. *Ocul Surf.* 2017;441-515.
 55. Bron AJ, Paiva CS De, Chauhan SK, et al. The Ocular Surface TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):438-510. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.011
 56. Holsapple MP, West LJ, Landreth KS. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Res Part B - Dev Reprod Toxicol.* 2003;68(4):321-334. doi:10.1002/bdrb.10035
 57. Van Beek AA, Hoogerland JA, Belzer C, et al. Interaction of mouse splenocytes and macrophages with bacterial strains in vitro: The effect of age in the immune response. *Benef Microbes.* 2016;7(2):275-287. doi:10.3920/BM2015.0094
 58. Sullivan DA. Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. *Ocul Surf.* 2004;2(2):92-123. doi:10.1016/S1542-0124(12)70147-7
 59. Li K, Zhang C, Yang Z, Wang Y, Si H. Evaluation of a novel dry eye model induced by oral administration of finasteride. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):8763-8770. doi:10.3892/mmr.2017.7754
 60. Hawley D, Ding J, Thotakura S, et al. RNA-Seq and CyTOF immuno-profiling of regenerating lacrimal glands identifies a novel subset of cells expressing muscle-related proteins. *PLoS One.* 2017;12(6):1-26. doi:10.1371/journal.pone.0179385
 61. Upton D, Richardson C, Andrews A, Rippon M. Wound pruritus: prevalence, aetiology and treatment. *Jouranl Wound Care.* 2013;22(9). doi:10.12968/jowc.2013.22.9.501
 62. Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Imagawa T, Uehara M, Tsubota K. D-beta-hydroxybutyrate protects against corneal epithelial disorders in a rat dry eye model with jogging board. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(7):2379-2387. doi:10.1167/iovs.04-1344
 63. Zoukhri D, Hodges RR, Byon D, Kublin CL. Role, of proinflammatory cytokines in the impaired lacrimation associated with autoimmune xerophthalmia. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(5):1429-1436.
 64. Schechter JE, Warren DW, Mircheff AK. A lacrimal gland is a lacrimal gland, but rodent's and rabbit's are not human. *Ocul Surf.* 2010;8(3):111-134. doi:10.1016/S1542-0124(12)70222-7
 65. Matsumoto I, Tsubota K, Satake Y, et al. Common T cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1969-1977. doi:10.1172/JCI118629
 66. Li H, Dai M, Zhuang Y, Carolina N, Blokland V. A T Cell Intrinsic Role of Id3 in a Mouse Model for Primary Sjögren's Syndrome. *Immunity.* 2004;21:551-560.
 67. Roma Pahwa; Amandeep Goyal; Pankaj Bansal; Ishwarlal Jialal. Chronic inflammation. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. Published 2020. Accessed February 4, 2021.
 68. H.B.Fleit. *Pathobiology of Human Disease.* (Linda M. M, Richard N. M, eds.). Elsevier; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6
 69. Yamaguchi T. Inflammatory response in dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(14 Special Issue):DES192-DES199. doi:10.1167/iovs.17-23651
 70. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
 71. Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun.* 2010;34(4):400-407. doi:10.1016/j.jaut.2009.10.004
 72. Damato BE, Allan D, Murray SB, Lee WR. Senile atrophy of the human lacrimal gland: the contribution of chronic inflammatory disease. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(9):674-680. doi:10.1136/bjo.68.9.674
 73. Dietrich J, Ott L, Roth M, et al. MSC Transplantation Improves Lacrimal Gland Regeneration after Surgically Induced Dry Eye Disease in Mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-54840-5

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen Mitgliedern des Labors für experimentelle Ophthalmologie. Durch Professor Stefan Schrader, Dr. med. Mathias Roth, Dr. rer. nat. Sonja Mertsch und ganz besonders durch Dr. rer. nat. Jana Dietrich wurde mir diese Arbeit erst möglich gemacht.

Bei Anna Theiß möchte ich mich für die Unterstützung trotz der Abende am Schreibtisch bedanken. Meinen Eltern gilt mein Dank für den Beistand während des Studiums und der Dissertation danach. Danken möchte ich außerdem meinen Kommilitonen und Freunden, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.