Aus der Klinik für Augenheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Geerling

Evaluation der murinen Augenoberfläche nach experimentell induziertem trockenem Auge

Dissertation

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

vorgelegt von

Lolita Ott

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charlotte von Gall

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jana Dietrich, Lolita Ott, Mathias Roth, Joana Witt, Gerd Geerling, Sonja Mertsch, Stefan Schrader, 2019, Mesenchymal Stem Cell Transplantation Improves Lacrimal Gland Regeneration after surgically Induced Dry Eye Disease in Mice www.nature.com/scientificreports doi: 10.1038/s41598-019-54840-5

Zusammenfassung

Das trockene Auge (auch: *Dry Eye Desease*, DED) ist weltweit eine der häufigsten Erkrankungen der Augenoberfläche. Der Untergang von funktionellem Tränendrüsengewebe gilt als eine der Hauptursachen für die Entwicklung der hypovolämischen Form des DED (auch: *Aqueous-Deficient Dry Eye*, ADDE). Es sorgt bei Betroffenen für eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität und es existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt keine kurativen Therapieansätze. Ein potenzieller Behandlungsansatz stellt die Regeneration des geschädigten Tränendrüsengewebes mittels mesenchymaler Stammzellen (MSC) dar. Der therapeutische Nutzen dieser Zellen wurde bereits in vielen Studien beschrieben sowie in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen. Ziel dieser Studie war es, mögliche Auswirkungen der in die Tränendrüse transplantierten MSC auf die murine Augenoberfläche nach zuvor induziertem ADDE zu evaluieren.

In den Vorstudien wurde bereits ein murines *in vivo* Schädigungsmodell der Tränendrüse zur Auslösung einer ADDE etabliert, welches auch in dieser Studie angewendet wurde. Mittels einer Ductus-Ligatur der rechten Tränendrüse wurde ein Untergang von funktionellem Tränendrüsengewebe induziert. Nach 3 Tagen wurde die Ligatur wiedereröffnet und primäre murine MSC aus männlichen Tieren bzw. NaCl bei der Kontrollgruppe wurden in die Tränendrüse injiziert. Es erfolgte eine Beurteilung der murinen Augenoberfläche am Tag der Ductus-Eröffnung (Tag 0), Tag 5 und Tag 21 nach Eröffnung. Die Beurteilung der Augenoberfläche wurde zum einem *in vivo* mittels Fluoreszein-Färbung durchgeführt, zum anderen mittels Immunhistochemie, histologischer Färbungen mittels Hämatoxylin-Eosin (Beurteilung der kornealen epithelialen Zelldicke und Schichten) und PAS-Reaktion (Darstellung muzinbildender Becherzellen). Als immunhistochemische Marker kamen zum Einsatz Antikörper gegen Immunzellen, der MSC sowie Epithelzellen, Apoptose und Proliferation.

Die Untersuchung der Augenoberfläche zeigte eine deutliche Schädigung durch die Ductus-Ligatur, welche sich insbesondere in einer Abnahme der Epithelzelldicke, der Becherzellzahl und einer Zunahme von apoptotischen Zellen darstellte. Zudem konnte man im Zuge eines Inflammationsprozesses eine Zunahme der Granulozyten (Ly6G+) in der NaCl-Gruppe an Tag 5 beobachten. Diese Schädigung ließ sich jedoch nur auf einer histologischen Ebene beobachten, makroskopisch konnte kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Auf der Augenoberfläche konnten zudem anhand der Marker (GFP, Nestin) keine MSC nachgewiesen werden.

Es zeigte sich in den MSC-Gruppen einen Anstieg der Zelldicke und Zellschichten an Tag 5 im Vergleich zu Tag 21, sowie insgesamt weniger apoptotische und Ly6G-positive Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dies lässt Rückschlüsse über ein frühes regeneratives therapeutisches Potential der MSCs für die Augenoberfläche bei einer geschädigten Tränendrüse zu.

Summary

The Dry Eye Syndrome or Dry Eye Disease (DES, DED) is one of the most common diseases of the ocular surface. Damaged functional lacrimal gland (LG) tissue is considered as one of the main courses of a severe aqueous-deficient dry eye (ADDE). Patients suffer from a significant loss of life quality and there are no known curative therapy options to date. One promising therapy could be the regeneration of the LG by mesenchymal stem cells (MSC). These cells are known for their regenerative potential, which was confirmed in many studies and in previous projects of our research group. The purpose of this study was to evaluate the effects of transplanted MSC on the murine ocular surface after an experimentally induced ADDE.

Therefore, our research group has already established an *in vivo* mouse model of the DED based on a damaged lacrimal gland. This is based on a ligation of the right lacrimal gland ductus, which then causes a tissue damage of the LG. After 3 days the ligature was re-opened and murine MSC of male mice were injected into the damaged LG in one group, whereas the control group received a saline injection. Hereinafter, the murine ocular surface was investigated on day 0 (day of the opening of the ligature), day 5 and day 21. This was performed via *in vivo* fluorescein staining and additionally *ex vivo* with immunohistochemistry and histological staining with hematoxylin and eosin (observation of the corneal epithelial thickness and cell numbers) as well as PAS-staining (goblet cells of the conjunctiva). For immunohistochemistry, markers against inflammation, MSC, epithelial cells, apoptosis and proliferation were used.

The evaluation of the ocular surface revealed a visible damage due to the ductus ligature. This was especially seen in the loss of corneal epithelial thickness, loss of goblet cells and increasing numbers of apoptotic cells. Additionally, we could detect an increase of granulocytes (Ly6G+) in the saline group at day 5, which could be due to an inflammatory process. These damage signs were only on a histological level detectable, and we could not detect any remarkable differences by using fluorescein staining. In addition, no MSC could be found on the eye surface based on the used markers (anti-GFP, anti-Nestin).

In the MSC groups we noticed a significant increase of the corneal epithelia cells layer and cell number on day 5 compared to day 21, also there were less apoptotic cells and granulocytes in MSC groups than in saline groups. This can be considered as an indication for an early regenerative therapeutical potential of the MSC on the ocular surface after previously damaged lacrimal gland.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADDE	aqueous-deficient dry eye
ALA	Alpha-Linolensäure
B-Zellen	auch: B-Lymphozyt, von: Bursa Fabricii
BSA	bovine serum albumin
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD3	cluster of differentiation 3
CD45R	cluster of differentiation 45R (auch: B220)
CD68	cluster of differentiation 68
СК15	Cytokeratin 15
C57BL/6	C57 black 6 mouse
d	Tag/Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DED	dry eye desease
DES	dry eye syndrome
DOG	Deutsche ophthalmologische Gesellschaft
dpt	Dioptrie
EMMPRIN	extracellular matrix-metalloproteinase inducer
eGFP	enhanced GFP (green fluorescent protein)
engl.	Englisch, auf englisch
etc.	et cetera
FBUT	fluorescein (tear) break-up-time
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
HE	Hämatoxylin und Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen</i> – DR Isotyp
HRP	horse reddish peroxidase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1

IDEEL	Impact of Dry Eye on Everyday Life Questionnaire	
IgA	Immunglobulin A	
IgG	Immunglobulin G	
lgY	Immunglobulin Y	
IL-1	Interleukin-1	
kg	Kilogramm	
Ki67	Antigen Ki67 (Ki für Kiel)	
I	Liter	
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz	
LASIK	Laser-in-situ-Keratomileusis	
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1	
LIPCOF	lid-parallel conjunctival fold	
Ly6G	lymphocyte antigen 6 complex locus G6D	
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase	
mg	Milligramm	
min.	Minuten	
ml	Milliliter	
mM	Millimolar	
mm	Millimeter	
mm²	Quadratmillimeter	
MMP-9	Metalloprotease 9	
mOsm/l	Osmotisch wirksame Teilchen pro Liter (^3)	
MSC	Mesenchymale Stammzellen	
MUC5AC	Mucin 5AC	
n	Größe der Stichprobe	
Ν.	Nervus	
NaCl	Natriumchlorid, auch: Kochsalz	
NFkB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	
nm	Nanometer	
NOD	nonobese diabetic	
NSAID	Nicht-steroidale Antirheumatika	
OGS	oxford grading scale	
OSDI	ocular surface desease index	
р	<i>probabilitas,</i> p-Wert	
PAS	periodic acid-Schiff reaction	

PBS	phosphat-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
рН	potentia Hydrogenii
P2Y2	Purinergic receptor P2Y2
p63 α	auch: <i>tumor protein 63</i> (TP63)
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RH-NGF	recombinant human nerve growth factor
SPEED	Standard Patient Evaluation of Eye Dryness
US	Unites States (american)
USA	United States of America
sec.	Sekunden
s.	siehe
s.u.	siehe unten
T-Zellen	auch: T-Lymphozyten, von: Thymus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBS-Tween-20	500µl Tween-20 auf 1l 1x Tris-buffered saline
TBUT	tear break-up time
ΤGFβ1	transforming growth factor eta 1
ТМА	tear meniscus area
тмн	tear meniscus height
TMR	tear meniscus radius
TNF-α	Tumornekrosefaktor $lpha$
TRPV-1	transient receptor potential vanilloid type 1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SYL1001	auch: Tivanisiran
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZETT	zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche
	Tierschutzaufgaben
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomische und physiologische Grundlagen der Augenoberfläche	1
1.2. Der Tränenfilm	2
1.2.1 Funktion des Tränenfilms	2
1.2.2. Aufbau des Tränenfilms	3
1.3. Das trockene Auge	3
1.3.1. Definition der Erkrankung	3
1.3.2. Epidemiologie	4 5
1.3.3. Pathogenese und Komplikationen	5 6
1.3.4. Killische Diagnostik der Erklankung 1.3.5. Aktuelle Behandlungsontionen im klinischen Alltag	0 7
1.3.6. Aktuelle Therapieansätze in der klinischen Forschung	
1.3.7. Aktuelle Therapieansätze in der theoretisch-experimentellen Forschung	11
1.4 Mesenchymale Stammzellen als Therapieoption	11
1.5. Zielsetzung und Arbeitshypothese	12
2. Material und Methoden: Material	13
2.Material und Methoden: Methoden	19
2.1. Tierversuch und Krankheitsmodell	19
2.1.1 Organisation und Supervision	19
2.1.2. Isolation der mesenchymalen Stammzellen	19
2.1.3 Mausmodell: Ductus Ligatur	
2.1.4 Probenentnahme und Versuchsaufbau	21
2.2. Fluoreszein Farbung	
2.3. Histologie an Paraffinschnitten	22
2.3.1. Gewinnung von histologischen Proben	22
2.3.2 FallatoxyIII-7E05III Falbulg	25 23
2.3.4. Immunhistologie	23
2.4. Immunhistologia an Whole Mounts der Korneg	25
2.4.1 miniarinistologie an whole would be Komea	25 25
2.4.2 Durchführung der Färbung	25
2.4.3 Auswertung der Färbung	
2.5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Beurteilung des kornealen Epithels in vivo (Fluoreszein)	27
3.2. Hämatoxylin und Eosin Färbuna	27
3.2.1. Auszählung der Epithelzellschichten	
3.2.2 Messung der Epithelzelldicke	
3.3. PAS Färbung (Muzinbildende Becherzellen der Konjunktiva)	32
3.4.1 Oberflächenmorphologie	34
3.4.2. Proliferation	35
3.4.3. Apoptose	37
3.4.5. CD3 (T-Zellen)	
3.4.6. CD68 (Makrophagen)	42

3.4.7. Ly6G (Granulozyten)	44
3.4.8. B220 (B-Zellen)	46
3.5. Detektion von Stammzellen auf der Augenoberfläche	48
4. Diskussion	50
4.1.1. Veränderung der Morphologie auf der Augenoberfläche	51
4.1.2. Ausmaß der Entzündungsreaktion	53
4.1.3. Wanderungsverhalten der MSCs (Whole Mount Methode)	53
4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	54
4.1.5. Besteht ein Hinweis auf eine erfolgreiche Therapie mit MSCs?	54
4.2. Ist der Versuchsaufbau gelungen im Hinblick auf die Fragestellung/Arbeitshypothese?	55
4.2.1. Andere gängige Modelle zur Erforschung des trockenen Auges	55
4.2.2. Vergleich mit den Ergebnissen von Dr. Dietrich (Evaluation der Ductus Ligatur und des	
Regenerationspotentials der MSCs auf die Tränendrüse)	57
4.3.3. Mögliche Lösungsvorschläge für ein signifikanteres Ergebnis	57
4.3. Evaluation der Eraebnisse im Hinblick auf die Arbeitshypothese	
4.3.1. Berücksichtigung eigener Ergebnisse	
	50
4.4. Abschließendes Fazit	59
Literatur- und Quellenverzeichnis	60
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	
Anhang	64
Danksagung	79

1. Einleitung

1.1. Anatomische und physiologische Grundlagen der Augenoberfläche

Das Auge ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen und dient der primären Aufnahme und Weiterleitung von optisch-visuellen Umgebungsreizen. Das paarig angelegte Organ sitzt in der knöchernen Orbita und lässt sich in einen vorderen und einen hinteren Augenabschnitt unterteilen. Der vordere Augenabschnitt hat direkten Kontakt zur Außenwelt und ist der äußeren Umgebungseinwirkung ausgesetzt. Zu ihm werden die Konjunktiva (Bindehaut), die Kornea (Hornhaut), Sklera (Lederhaut), Iris (Regenbogenhaut), Ziliarkörper, Linse sowie die beiden Kammern samt Kammerwasser gezählt. Der hintere Augenabschnitt beinhaltet das *Corpus vitreum* (Glaskörper), die Choroidea (Aderhaut) und die Retina (Netzhaut) samt der Papilla *N. optici* [1]. Zur Augenoberfläche zählen anatomisch die Kornea und die Konjunktiva, welche die Skleren und die Augenlidinnenseiten überziehen.



Abb. 1.1.: Vorderer Augenabschnitt des Menschen. Die Proportionen und Maßstäbe entsprechen aus Anschauungsgründen nicht den realen Größen. Legende: 1: Linse (*Lens cristallina*), 2: Hornhaut (Kornea), 3: Bindehaut (Konjunktiva), 4: Regenbogenhaut (Iris), 5: Lederhaut (Sklera), 6: Aderhaut (Choroidea), 7: Glaskörper (*Corpus vitreum*), 8: Schlemm-Kanal, 9: Zonulafasern (*Fibrae zonales*).

Die menschliche Kornea weist bei einem Erwachsenen einen Durchmesser ca. 10-13 mm auf, sowie eine Dicke im Zentrum von ca. 0,55 mm und in der Peripherie von ca. 0,7 mm [2]. Sie besteht aus fünf Schichten (Epithel, Basalmembran, Bowman-Lamelle, Stroma, Descemet-Membran, Endothel) und enthält keine Gefäße. Sie verfügt über einen langsamen, bradytrophen Stoffwechsel und bezieht ihre Nährstoffe über Diffusion aus dem Randschlingennetz (Gefäße der limbalen Bindehaut), sowie über den Austausch aus dem Kammerwasser und dem Tränenfilm.

Am Rand, der die Übergangszone zu den Skleren darstellt, dem sogenannten *Limbus corneae*, befinden sich die limbalen Stammzellen, welche sich in korneale Epithelzellen ausdifferenzieren können [1, 2]. Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel kann daher im Verletzungsfall sehr schnell regenerieren, sodass kleine Defekte im Zeitraum von Stunden bis wenigen Tagen verschlossen werden können. Solche Schäden können im Fall einer gestörten Regeneration der Epithelzellen das Eindringen von Pathogenen ins Augeninnere begünstigen.

Die Kornea wird von dem 1. Trigeminusast (*N. ophthalmicus* V1) sensibel innerviert und ist hoch empfindlich [1, 2]. Sie dient in ihrer Hauptfunktion der Lichtbrechung. Mit 43 dpt hat sie den höchsten Anteil an der Gesamtbrechkraft des Auges, während die Linse lediglich 10-20 dpt dazu beiträgt. Um ihrer Aufgabe gerecht zu werden, muss die Transparenz und eine intakte, glatte Oberfläche der Kornea gewährleistet sein. Die Transparenz beruht hauptsächlich auf der regelmäßigen Anordnung der Kollagenlamellen im kornealen Stroma und einem konstanten Wassergehalt im Stroma.

Die Konjunktiva unterteilt sich topographisch in *Conjunctiva tarsi* (Innenseite der Lider), *Conjunctiva fornicis* und die *Conjunctiva bulbi*. Sie verfügt überwiegend über ein mehrschichtiges, nicht-verhornendes Plattenepithel, lediglich die *Conjunctiva tarsi* hat ein mehrschichtiges, hochprismatisches Epithel [3]. Die Konjunktiva ist im Gegensatz zu der Kornea stark vaskularisiert und reagiert somit empfindlich bei mechanischen Reizen und Entzündungsreaktionen. Im nasalen Lidspaltenbereich befindet sich die *Plica semilunaris*, eine halbmondförmige Falte, die der Nickhaut mancher Tiere entspricht.

Die Konjunktiva gewährleistet neben mechanischen Schutz und Gleitfähigkeit des *Bulbus* zusätzlich einen immunologischen Schutz. Sie beinhaltet Lymphozyten und Plasmazellen, die sich follikelähnlich unter der *Conjunctiva tarsi* und den Umschlagfalten gruppieren und immunmodulatorische Substanzen wie Prostaglandine, Interferone und Immunglobuline auf die Augenoberfläche sezernieren. Somit findet hier eine erste Immunabwehr statt. Histologische Untersuchungen der Konjunktiva legen nahe, dass sich bereits in einer gesunden Bindehaut diese Zellen der Immunantwort befinden. Die größte Population scheinen dabei die CD3-positiven T-Zellen auszumachen, dicht gefolgt von Makrophagen [4, 5].

In der Konjunktiva befinden sich zudem muzinproduzierende Becherzellen, deren Sekret einen Teil des Tränenfilms ausmacht (s. 1.1.2).

1.2. Der Tränenfilm

1.2.1 Funktion des Tränenfilms

Der Tränenfilm benetzt die Augenoberfläche und bietet neben einer mechanischen Barriere zu Außenwelt einen Schutz vor dem Austrocknen. Darüber hinaus dient er der immunologischen Abwehr, erhält die Homöostase, bietet eine Gleitfähigkeit der tarsalen Konjunktiva gegenüber der Kornea und glättet zudem die Augenoberfläche für eine optimale optische Abbildung. Nur durch eine intakte Benetzung der Kornea mit dem Tränenfilm kann eine glatte Oberfläche dieser gewährleistet werden, was entscheidend für eine scharfe Sehwahrnehmung ist. Die Tränenflüssigkeit trägt zudem einen wichtigen Teil zu der Ernährung der bradytrophen Kornea bei, indem sie wichtige Metabolite wie Aminosäuren und Glucose über selektive Diffusion bereitstellt.

1.2.2. Aufbau des Tränenfilms

Bereits 1946 schlugen Wolff et al. vor, den Tränenfilm in 3 Schichten bzw. Kompartimente aufzuteilen [6]. Demnach besteht der Tränenfilm aus 3 Schichten, von innen nach außen: Muzinschicht, wässrige Schicht und Lipidschicht. Die innere Schicht, die direkt dem kornealen Epithel aufliegt, ist die ca. 0,8 µm dicke Muzinschicht. Diese wird hauptsächlich von den Becherzellen der Bindehaut produziert und dient dank ihrer hydrophilen Eigenschaft der Tränenfilmstabilisierung und der besseren Benetzung der ganzen Augenoberfläche durch die darauf aufliegende nächste Schicht, den Wasseranteil des Tränenfilms. Dieser bildet mit ca. 8 µm den mittleren, größten Teil des Tränenfilms und wird von der *Glandula lacrimalis* (Tränendrüse) und den akzessorischen Tränendrüsen (*Glandulae lacrimales accessoriae*) produziert. Neben den ca. 98-99% Wasseranteil befinden sich in dieser Schicht zudem tränenspezifische Proteine, wie Lysozym, ß-Lysin, Lactoferrin und γ - Globulin (IgA), welche einen antimikrobiellen Schutz gewährleisten. Der wässrigen Schicht liegt ganz außen die ca. 40 nm dicke Lipidschicht auf. Die dafür notwendigen Lipide werden nahezu vollständig von den Meibom-Drüsen des Lidrandes produziert [7]. Die hydrophobe Lipidschicht gewährleistet einen Schutz vor dem vorzeitigen Verdunsten.

Obwohl dieses Modell noch in vielen Standardlehrwerken Anwendung findet, gibt es in der Literatur häufig Hinweise darauf, dass dieses Modell zu vereinfacht sein könnte. So wird z.B. diskutiert, dass der Tränenfilm eine dynamische Einheit ist, welche sich ständig verändert und bei Lidbewegung in verschiedene regionale (Fornix, Menisci, preokulär) Kompartimente unterteilt. Je nach Kompartiment unterscheidet sich der Tränenfilm dann in seiner Dicke und Zusammensetzung [7]. Dennoch muss betont werden, dass auch hier das Verständnis insbesondere auf die Herkunft der Tränenbestandteile nicht abschließend ist.

1.3. Das trockene Auge

1.3.1. Definition der Erkrankung

Das trockene Auge (englisch: Dry Eye Desease, DED, Sicca-Syndrom) beschreibt als Krankheit einen Zustand der Augenoberfläche, bei dem die Schutzbarriere des Tränenfilms für äußere Einflüsse herabgesetzt ist. Hier gibt es nach heutigem Verständnis mehrere Formen der Erkrankung, zum einen den quantitativen Mangel an Tränenvolumen ("hyposekretorisch") oder eine unzureichenden Tränenqualität (evaporativ). Die Pathogenese ist meist multifaktoriell bedingt. Allen Formen gemeinsam ist der Verlust der Homöostase des Tränenfilms, der somit zu seiner Instabilität und Hyperosmolarität des Tränenfilms führt, welche dann Entzündungen und Schädigungen der Augenfläche begünstigen können [8]. Bei der qualitativen Form werden diverse Ursachen diskutiert. Es gibt diverse bekannte Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus, Rosazea, atopische Dermatitis und Vitamin-A-Mangel, die bei der Entstehung eine Rolle spielen könnten. Des Weiteren kommt diese Form auch als Nebenwirkung von diversen Medikamenten, z.B. Beta-Blockern, lokalen Glukokortikosteroiden und Östrogen-Präparaten vor. Auch neurogene Schäden, z.B. eine Fazialisparese und ein daraus resultierender Lagophthalmus oder eine Keratitis neuroparalytica (bei einer Trigeminusläsion) können zugrunde liegen. Als eine iatrogen induzierte Ursache können Operationen am Auge, wie z.B. LASIK (*Laser-in-situ-Keratomileusis*) erwähnt werden [9].

Die quantitative Form wird in der Literatur meist zusätzlich nach Sjögren-Syndrom (autoimmunen Ursprungs) und Non-Sjögren (nicht autoimmun) unterteilt. Das Sjögren-Syndrom stellt eine Autoimmunerkrankung dar, bei welcher es zu einer Zerstörung exokriner Drüsen, besonders nennenswert Speichel- und Tränendrüse, kommt. Dies resultiert schließlich in den Leitsymptomen der Mundtrockenheit und der trockenen Augen [1].

Der Non-Sjögren-Typ ist diejenige Form, die besonders gehäuft mit zunehmendem Alter auftritt, da es hier zu einem vermehrten fibrotischem Gewebeumbau und Involution der Tränendrüse kommt, welche dann in einem Verlust von funktionellem Tränendrüsengewebe resultiert. Dies hat eine verminderte Tränensekretion (also eine Hypo-) Sekretion zur Folge, das Volumen der wässrigen Tränenkomponente nimmt ab und führt somit zu einer Störung des Tränenfilms und der Benetzung des Auges. Die hyposekretorische Form liegt klinisch definitionsgemäß bei einem Schirmer-Test < 5 mm nach einer 5-minütigen Wartezeit vor (entspricht Schirmer-I-Test, ohne Anwendung eines Lokalanästhetikums) [2].

1.3.2. Epidemiologie

Das trockene Auge ist eine der häufigsten Augenerkrankungen weltweit. Die Prävalenz schwankt je nach geographischer Lage von 5 bis 50% [10]. In Deutschland und des USA liegt die Prävalenz bei ca. 15% [11, 12]. In Süd-Ost-Asien herrscht weltweit die höchste Prävalenz des symptomatischen DES mit ca. 20-52,4% [10].

Darüber hinaus kann man feststellen, dass das DES eine Erkrankung ist, deren Prävalenz mit dem höheren Lebensalter steigt. Das Manifestationsalter liegt meist zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr und es gibt eine nahezu lineare Korrelation von Alter und Prävalenz. An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass viele Studien zum trockenen Auge grundsätzlich bei älteren Patienten durchgeführt werden. Eine repräsentative Studie in einer jüngeren Bevölkerung ist daher zukünftig wünschenswert [10].

Auch bezüglich des Geschlechtes sieht man eine Tendenz. Frauen scheinen deutlich häufiger betroffen zu sein, etwa 1,33 bis 1,74-mal häufiger als Männer [10]. Dies ist vermutlich nicht nur auf den Einfluss von Sexualhormonen zurückzuführen, sondern auch auf Hypothalamus-Hypophysen-

Hormone, Glukokortikoide, Insulin und Schilddrüsenhormonen. Interessant ist auch, dass offensichtlich das weibliche Geschlecht sowohl im Sinne des *Sexus* (biologisches Geschlecht) als auch *Gender* (soziales Geschlecht), eine Unterscheid bei der Prävalenz der Erkrankung bewirkt [13]. Dies könnte auf noch nicht ausreichend untersuchte Faktoren, z.B. auf geschlechts-spezifisches Verhalten und Zugang zum Gesundheitssystem zurückzuführen sein.

Andere Risikofaktoren bezüglich schädlicher Umwelteinflüsse, wie Umweltbelastung mit (Zigaretten-)Rauch, Ozon, Luft aus Klimaanlagen und trockene Heizungsluft werden diskutiert. Auch ein reizender Einfluss, z.B. lange Arbeitszeiten am Bildschirm, steht unter Verdacht, das DES zu begünstigen.

Nicht zuletzt müssen auch individuelle Vorerkrankungen des Betroffenen berücksichtigt werden. Die genauen Zusammenhänge sind nicht abschließend geklärt, aber erste Daten konnten zeigen, dass v.a. Erkrankungen, die das Immunsystem betreffen, eine Rolle spielen. Dazu gehört das Sjögren-Syndrom, aber auch rheumatoide Arthritis und diverse Kollagenosen.

1.3.3. Pathogenese und Komplikationen

Es ist anzunehmen, dass viele pathologische Prozesse beim trockenen Auge auf eine gesteigerte Osmolarität des Tränenfilms zurückzuführen sind. Die normale Osmolarität des Tränenfilms beträgt ca. 300 mOsm/L, kann aber beim trockenem Auge auf Werte zwischen 311-360 mOsm/L steigen [7]. Untersuchungen zur Veränderung der Osmolarität beim trockenen Auge schlagen vor, Cut-off-Werte zu bestimmen, z.B. ab 308 mOsm/L für eine milde Form des trockenen Auges und ab 316 für eine schwere Form [14, 15].

Die Hyperosmolarität des Tränenfilms führt über diverse biochemische Signalwege zu einer gesteigerten Inflammation, einer erhöhten Apoptoserate und einer gesteigerten Ablösung der Zellen aus dem epithelialen Verband der Augenoberfläche [7]. Letztere erklärt sich zum einen durch die aufgrund der Hyperosmolarität gesteigerten Expression von EMMPRIN (*extracellular matrix-metalloproteinase inducer*) und eine Aktivierung von Metalloproteasen, v.a. MMP-9, die die *Tight junctions* des Oberflächenepithels destabilisieren [16]. Dies hat eine Schädigung des besagten kornealen und konjunktivalen Epithels zur Folge, welche in Apoptose dieser resultieren kann [17] . Darüber hinaus ist beim trocken Auge die Lidschlussrate erhöht, wodurch es zu erhöhten Scherkräften und somit mechanischem Stress der Augenoberfläche kommt, dies führt ebenfalls zu einem gesteigerten epithelialen Zellumsatz [18] .

Die Hyperosmolarität bewirkt zudem über eine Aktivierung von MAP-Kinase (*Mitogenactivated protein* Kinase) und NFkB (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) eine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie bspw. IL-1 und TNF- α [18]. Dies hat eine Migration von Entzündungszellen zur Augenoberfläche zur Folge. Der Tränenfilm beinhaltet antimikrobielle, anti-inflammatorische Substanzen, wie z.B. Lactoferrin, Lysozym oder Lipocalin. Eine

Hyperosmolarität kann offensichtlich den Schutz des Epithels durch diese Substanzen herabsetzten [7]. Zudem hat man eine erhöhte Expression von ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) beim DES festgestellt, wodurch Zellen des Immunsystems leichter am Endothel der Konjunktiva oder Kornea binden können [19]. Dies könnte auf einen zusätzlichen Weg der epithelialen Schädigung mittels immunologischer Reaktion deuten. In Folge einer chronischen Entzündungsreaktion kommt es z.B. im Verlauf zum Untergang muzinbildender Becherzellen, was einen negativen Effekt auf die Tränenfilmqualität und somit auf den Schutz gegenüber schädlichen äußeren Einflüssen hat.

Es konnte festgestellt werden, dass es beim DES zu einem Abfall der muzinbildenden Becherzellen in der Konjunktiva kommt (normal beim Menschen: je nach Studie von 8,84/mm² bis 20-45/mm² [1]). Bei einem trockenen Auge kann man je nach Methode und Studie eine Reduktion der Becherzellen um 7% bis 70% finden [19, 20]. Beim DES wurde zudem das für Becherzellen spezifische Muzin MUC5AC, welches direkt für die Stabilisierung des Tränenfilms auf der Augenoberfläche verantwortlich ist, in geringeren Mengen im Tränenfilm nachgewiesen [21].

Beim längeren Persistieren der Erkrankung können sich langfristige Folgeschäden manifestieren, die im schlimmsten Fall irreversibel sind. Diese können z.B. eine Schädigung des kornealen Epithels durch Ulzerationen mit Perforationsgefahr bedeuten.

1.3.4. Klinische Diagnostik der Erkrankung

Im klinischen Alltag gibt es mehrere diagnoseführende Vorgehensweisen, um den Verdacht eines trockenen Auges zu bestätigen. Allen Untersuchungen sollte eine ausführliche Anamnese vorausgehen, die die Beschwerden und Risikofaktoren des Patienten abdeckt. Klinisch äußern sich bei den Patienten Symptome wie Trockenheits- oder Fremdkörpergefühl, Juckreiz und Brennen der Augen. Bei Bedarf können auch spezielle Fragebögen eingesetzt werden, z.B. der OSDI (*Ocular Surface Desease Index*), SPEED (*Standard Patient Evaluation of Eye Dryness*) oder IDEEL (*Impact of Dry Eye on Everyday Life questionnaire*) [22].

Dem sollte eine umfassende Inspektion folgen, gegebenenfalls mithilfe einer Spaltlampe. Während man bereits in der frühen Erkrankungsphase ein gerötetes Auge feststellen kann, können sich mit zunehmender Erkrankungsdauer diverse krankheitsspezifische Phänomene bzw. Folgeerkrankungen auf der Augenoberfläche manifestieren. Auf dem Hornhautepithel beispielsweise, können punktförmige Epitheldefekte auftreten (*Keratitis superficialis punctata*). Außerdem wurden Fälle von Filamentärkeratitis (*Keratitis filiformis*) mit ca. 2mm langen herabhängenden Fäden vom kornealen Epithel beschrieben [22]. Bei der Konjunktiva gilt die Bildung von parallel zur Lidkante verlaufenden Falten (LIPCOF) als nahezu pathognomisch für das DES.

Je nachdem, welchen Parameter der Erkrankung man speziell untersuchen will, gibt es darüber hinaus unterschiedliche funktionelle Tests.

6

Bei der quantitativen Messung des Tränenvolumens stellt der Schirmer-Test den Goldstandard dar. Hierbei wird die Menge des wässrigen Anteils an der Sekretion bewertet. Beim Schirmer-I-Test (Bewertung der Reizsekretion) gilt eine Färbung von < 15mm bei einem Patienten mit unbetäubtem Auge nach einlegen des Lackmusstreifens in das Unterlid als pathologisch. Beim Schirmer-II-Test (Bewertung der basalen Sekretion) wird zunächst eine lokale Betäubung durchgeführt, als pathologisch gelten Werte von unter 5mm in 5 Minuten.

Die Messung des Tränenvolumens kann z.B. mittels Meniskometrie erfolgen. Hierbei können Parameter wie die Höhe des Meniskus (TMH), die Kurvatur (TMR) oder Fläche (TMA) verwendet werden [23].

Tests zur Untersuchung der Tränenfilmstabilität sind eher im Bereich des qualitativ trockenen Auges anzusiedeln. Hier gibt es beispielsweise die Tränenfilmaufrisszeit (auch: *tear break-up-time*, BUT), die, wenn sie pathologisch ausfällt, auf einen veränderten Lipidgehalt des Tränenfilms hindeutet. Aktuell wird dieser Test klassischerweise mit zusätzlicher Fluoreszein-Färbung (FBUT) durchgeführt, nicht-invasive Verfahren werden aber zunehmend angewendet.

Der Schaden, der auf der Augenoberfläche bemerkbar wird, lässt sich durch das Anfärben mit Lissamingrün, Fluoreszein oder Bengalrosa bewerten. Hierbei werden insbesondere abgestorbene Epithelzellen angefärbt, wodurch epitheliale Schäden z.B. im Rahmen eines trockenen Auges auf der Kornea und Konjunktiva deutlicher sichtbar werden.

Mittels Impressionszytologie kann ein Abfall der konjunktivalen Becherzellen beim trockenen Auge detektiert werden. Dafür wird die Konjunktiva nach vorheriger lokaler Betäubung mit einem speziellen Filterpapier abgetupft, welches danach mikroskopisch untersucht wird.

Wichtig für die Bestimmung des Schweregrades des DES scheint die Messung der Tränenfilmosmolarität zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die Osmolarität direkt mit der Schwere des DES korreliert [22]. Diese Methodik wird jedoch noch nicht flächenübergreifend eingesetzt, da hierzu besondere anspruchsvolle technische Voraussetzungen, wie Osmometer, vorhanden sein müssen.

Weiterhin möglich ist die Evaluation der Entzündungsaktivität auf der Augenoberfläche zum Beispiel durch Messung von MMP-9 im Tränenfilm mittels eines Schnelltest. Matrix-Metalloproteasen sind proteolytische Enzyme, die unter anderem die *tight junctions* im Oberflächenepithel zerstören und somit direkt zur Zerstörung der Schutzbarriere führen [18].

1.3.5. Aktuelle Behandlungsoptionen im klinischen Alltag

Die meisten der aktuell vorhandenen Therapieansätze sind nicht primär kurativ ausgerichtet, sondern bewirken lediglich eine Milderung der Symptome und verlangsamen das Voranschreiten der Erkrankung. Jeder medikamentösen Therapieform sollte eine nicht-medikamentöse Basistherapie vorausgehen, welche je nach Form des DED variieren kann. Diese beinhaltet eine ausreichende Aufklärung des Patienten zu seiner Erkrankung sowie zum Thema Lidrandpflege und adäquate Diät (ausreichende Trinkmenge, Aufnahme von essenziellen Fettsäuren), sowie Korrekturen von Fehlsichtigkeiten, Schiel- oder Lidfehlstellungen [24]. Systemische Ursachen sollten frühzeitig ausgeschlossen werden und nach Möglichkeit kausal behandelt werden.

Es existiert ein Stufenplan, welcher auch von der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft) und dem Berufsverband der Augenärzte Deutschlands (BVA) empfohlen wird [25]. Einzelne Stufen können hierbei miteinander kombiniert werden.

Ein simpler, symptomatischer Ansatz und die erste Stufe stellt die Anwendung von Tränenersatzmitteln dar. Hier existieren diverse Präparate auf dem Markt, welche z.B. Methylzellulose, Hyaluronsäure, Povidon etc. enthalten.

Ein hingegen invasiver Ansatz ist die Okklusion des Tränenweges mit dem Ziel der Retention der Tränenflüssigkeit auf der Augenoberfläche. Hier existieren beispielsweise so genannte *Punctum Plugs*, die entweder vorübergehend (absorbierbar, z.B. auf Kollagenbasis) oder dauerhaft (aus Silikon) eingesetzt werden können. Obwohl gute Erfolge mit diesen Therapien erzielt werden konnten, muss stets ein Komplikationsrisiko, wie z.B. Infektionen oder Granulombildung berücksichtigt werden. Alternativ kann das Tränenpünktchen auch operativ okkludiert werden.

Es gibt diverse Ansätze, die darauf abzielen, die Tränensekretion zu steigern bzw. zu stimulieren. Im asiatischen Raum existieren z.B. bereits zugelassene Präparate, wie Diquafosol tetrasodium (Diquas®; Santen, Osaka, Japan), einen P2Y2-rezeptor Antagonisten oder Rebamipid-Suspension (Mucosta®; Otsuka Pharmaceutical, Chiyoda, Japan), die sowohl Wasser- als auch Muzinsekretion fördern [26]. Diese Therapeutika sind jedoch in den restlichen Teilen der Welt nicht vertreten. Speziell für das Sjögren-Syndrom sind auch orale Parasympathomimetika wie z.B. Pilocarpin oder Cevimelin zugelassen. Intranasale Neurostimulatoren stellen hingegen einen nicht-medikamentösen Ansatz dar, sind aber bisher ebenfalls nicht weit verbreitet [24].

Zur Behandlung der Entzündungsreaktion und Linderung der Reizung werden Stoffe wie, z.B. Steroide oder Ciclosporin eingesetzt.

Ein neues Präparat ist Lifitegrast, welches als kompetitiver Antagonist die Bindung von leukozytenfunktionsassoziiertem Antigen-1 (LFA-1) und ICAM-1 blockiert. Diese wurde als kritischer Schritt im Hinblick auf die T-Zell-Aktivierung bezeichnet. Hierzu wurden bereits mehrere Studien mit Patienten durchgeführt. Es konnten gute Ergebnisse in Bezug auf Verträglichkeit und Symptomlinderung erzielt werden, jedoch wurde der gewünschte Ausmaß der therapeutischen Wirkung nicht erreicht [24].

Weitere Symptommilderung kann beispielsweise mit der Anwendung von warmen Kompressen oder Wärmelampen erreicht werden. Insbesondere bei der Meibom-Drüsen-Dysfunktion, bei der die Lipidphase des Tränenfilms gestört ist, scheint Wärme einen positiven Effekt zu haben, indem diese das zähe Sekret der Drüsen verflüssigt.

Eine Reihe von Studien hat die Bedeutung von entsprechender Diät beim DED bestätigt. Es sollte Wert auf eine ausreichende Flüssigkeitsaufnahme gelegt werden, da auch eine allgemeine Dehydration eine Hyperosmolarität des Tränenfilms zur Folge haben kann. Essenzielle Fettsäuren, wie Alpha-Linolensäure (ALA), Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren sollen ebenfalls von Bedeutung sein, weil sie die Produktion von diversen pro-inflammatorischen Zytokinen und die T-Zell-Proliferation herabsetzten. Es existieren zudem diverse weitere Studien, die zumindest einen zeitlich begrenzten positiven Effekt von Kaloriensowie Alkoholrestriktion und Aufnahme von Nahrungsergänzungsmitteln nahelegen. Es ist zu erwarten, dass wir auf diesem Gebiet in Zukunft mehr sehen werden, die unser Verständnis diesbezüglich verbessern [27].

Wirkstoffgruppe	Beispielsubstanzen
Oberflächenaktive Tränenersatzstoffe	Polyvinylalkohol
	Polyvinylpyrrolidon (Povidon)
	Polyethylenglykol
	Zellulosederivate
	Hyaluronsäure
Lipidhaltige Tränenersatzstoffe	Rizinusöl
	Lecithin
Immunmodulation	Hydrocortison
	Methylprednisolon
	Cyclosporin A
	Lifitegrast
Mukolytika	Acetylcystein
Vitamin-A-Säure	Tretinoin

Tabelle 1.1.: Etablierte medikamentöse	Therapie des DES	(Auswahl)
--	------------------	-----------

1.3.6. Aktuelle Therapieansätze in der klinischen Forschung

Angelehnt an das Prinzip der bereits vorhandenen Tränenersatzmittel, existieren aktuell Bestrebungen, biologische Alternativen zu verwenden, z.B. Tropfen auf Basis von autologem Serum. Diese bieten den Vorteil, in ihrer chemischen Zusammensetzung und den enthaltenen Wachstumsfaktoren eine hohe Ähnlichkeit den natürlichen Tränen gegenüber aufzuweisen [28, 29]. Man hat herausgefunden, dass Serum die epitheliale Wundheilung beschleunigt, die Entzündungsreaktion mildert und die Anzahl konjunktivaler Becherzellen steigert. Ein Nachteil könnte im Hinblick auf die zuvor notwendige Gewinnung von Spenderblut, Lagerung, und die in der Summe anfallenden hohen Kosten entstehen [24].

Die Verwendung von Augentropfen auf Basis von Nabelschnurblut weist ähnliche Vorteile auf wie die die Nutzung von autologen Serumaugentropfen. Es zeigen sich in einer Studie bessere Ergebnisse im Hinblick auf die Verbesserung der Symptome und des klinisches Erscheinungsbild, was möglicherweise auf die höhere Konzentration von Wachstumsfaktoren im Nabelschnurblut zurückzuführen ist [30].

Ein weiterer Ansatz beruht auf der Entdeckung des sog. TRPV-1-Kanals (*transient receptor potential vanilloid type 1*) in der Augenoberfläche (unter anderem: korneale Epithelzellen, konjunktivale Basalmembran). Dieser ist nach aktuellen Erkenntnissen maßgeblich an der Entstehung der Entzündungsreaktion und Schmerzen beteiligt. Der TRPV-1-Kanal kann mittels topischer Anwendung von SYL1001 bei Patienten inhibiert werden [31]. Dieser Ansatz bedarf noch weiterer Studien, scheint aber angesichts des aktuellen Stands vielversprechend zu sein.

Ein Schutz der Augenoberfläche kann auch mithilfe von therapeutischen Kontaktlinsen gewährleistet werden. Diese werden bereits in der Ophthalmologie bei einer Reihe von Erkrankungen, bspw. kornealen Erosionen eingesetzt. Es gibt auch Hinweise darauf, dass diese Kontaktlinsen bei einem schweren trockenen Auge über eine Reihe von Wirkmechanismen eine Schutzfunktion darstellen können. Nebenwirkungen und Risiken wie z.B. Infektionsgefahr sollten dennoch berücksichtigt werden [32].

Zur Milderung der Entzündungsreaktion werden aktuell mehrere, teilweise bereits bei anderen Erkrankungen erprobte, teilweise neue Präparate, getestet. Es gibt beispielsweise Studien zur guten Wirksamkeit von Tacrolimus und NSAIDs beim trockenen Auge [33, 34]. Andere beschäftigen sich mit antibiotischen Therapien, z.B. Tetrazyklinen oder Makroliden. Alternativ dazu stehen Biologika wie Lubricin (Proteogylkan-4) und rh-NGF (*recombinant human nerve growth factor*) im Fokus [35, 36].

Es existieren zudem auch vielversprechende Studien zur oralen Supplementation von Lactoferrin, einem Tränen-spezifischem Glykoprotein, welches eine anti-inflammatorische Wirkung hat [37].

Den medikamentösen Strategien stehen die operativen gegenüber. Hier sind Transplantate von Amnionmembran nennenswert. Diese gespendeten Membranen werden nach umfangreicher Vorbereitung über die Kornea und Konjunktiva transplantiert und befestigt. Man konnte bei dieser Methode eine Heilung von Epitheldefekten sowie eine Linderung der Entzündungsreaktion beobachten [38]. Darüber hinaus haben einige Forschergruppen mechanische Dacryoreservoirs getestet, die insbesondere für Patienten mit einem sehr hohen Tränenvolumenmangel infrage kommen [39]. Andere Gruppen verfolgen den Ansatz, Speicheldrüsen zu transplantieren, entweder teilweise (z.B. eine Transposition des Parotisductus zum konjunktivalen Fornix) oder als totale Transplantation der submandibulären Speicheldrüse. Diese ebenfalls serösen Drüsen könnten dann eine exokrine Funktion übernehmen und die Augenoberfläche auch mit epitheliotrophen Substanzen versorgen [24, 28]. Studien zeigen jedoch, dass obwohl die besagte Transplantation zur einer deutlich gesteigerten Tränensekretion führt, es aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen der Sekrete auch zu Nebenwirkungen kommen kann. Die Inflammationsprozesse bleiben beispielsweise unbeeinflusst und aufgrund der Hypoosmolarität des Sekretes kann ein korneales Ödem entstehen [40].

1.3.7. Aktuelle Therapieansätze in der theoretisch-experimentellen Forschung

Von den oben genannten Forschungsansätzen sind solche zu trennen, welche noch nicht am Patienten angewandt werden. Nennenswert wäre hier z.B. die Applikation von IL-1Ra-, TNF- α - und IL-17-Antagonisten [24]. All diese Strategien haben die Gemeinsamkeit, dass es hier vielversprechende Ergebnisse im Labor gibt, es jedoch weiterer Erkenntnisse bedarf, bis Studien an Menschen erfolgen können.

1.4 Mesenchymale Stammzellen als Therapieoption

Mesenchymale Stammzellen (auch: MSCs) sind adulte multipotente Stammzellen, die in einer Vielzahl von adultem Gewebe vorkommen und über eine Reihe von regenerationsfördernden und antiinflammatorischen Eigenschaften verfügen. Zum ersten Mal wurden sie im Knochenmark beschrieben [41]. Man weiß heute jedoch, dass sie in einer Vielzahl von adultem Gewebe vorkommen, darunter auch Fettgewebe, peripherem Blut und auch in der Tränendrüse [42, 43]. Diese Verfügbarkeit in unterschiedlichen Geweben stellt aufgrund von einfacher Gewinnung einen therapeutischen Vorteil dar. Durch ihre multipotente Eigenschaft können sie sich zu verschiedenen Gewebearten differenzieren, darunter Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten [44].

MSCs verfügen über eine Reihe an Eigenschaften, die eine Regeneration von Gewebe unterstützen können. So wirken MSCs entzündungshemmend, indem sie unter anderem die T-/ und B-Zell-Proliferation unterdrücken, sowie die Aktivität dendritischer Zellen und NK-Zellen herabsetzen [45-47]. Durch eine Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wird Apoptose runterreguliert und Angiogenese unterstützt. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren, wie bspw. TGF β 1 (*transforming growth factor* β 1) und HGF (*hepatocyte growth factor*) [48]. Diese spielen dann beim Gewebeumbau eine direkte Rolle.

MSCs zeigen eine nur geringe Immunogenität, da sie ihnen eine Reihe von Oberflächenmolekülen, wie HLA-DR fehlen [49]. Dies ist ebenfalls vorteilhaft bei einer allogenen Transplantation, da hier das Risiko einer Abstoßungsreaktion verringert ist.

Aktuell werden MSCs in der Forschung in den unterschiedlichsten Bereichen eingesetzt, darunter Graft-versus-Host-Reaktionen, Organtransplantationen, Autoimmunerkrankungen, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen [50]. Es gibt bereits Erfahrungen in vergleichbaren Anwendungsbereichen, etwa Studien zur Transplantation von humanen MSCs in Speicheldrüsen von Ratten [51] oder murinen MSCs in Speicheldrüsen von C57BL/6 Mäusen [52]. Zudem gibt es aktuell erste Studien an Menschen [53, 54]. Hier wurden den Patienten MSC transkonjunktival in die Tränendrüse injiziert und 126 Tage nach der Anwendung mittels OSDI, Tränenosmolarität, TBUT, Oxford Grade und Schirmer-Test I evaluiert. Die Studien legen nahe, dass MSC einen positiven Effekt auf den Verlauf der zu untersuchten Krankheit haben [53]. Im Hinblick auf das trockene Auge gab es bereits vielversprechende Ergebnisse, beispielsweise bei der Anwendung an Hunden [55, 56]. Andere Forschungsgruppen haben auch gute Resultate bei der Injektion von Knochenmark-MSCs in NOD-Mäuse mit einer Sjögren-assoziierten Form des DES [57].

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits den Effekt von exogen transplantierten Tränendrüsen-MSCs auf eine geschädigte murine Tränendrüse bei einem experimentell induzierten trockenen Auge zu untersucht [58]. Es zeigte sich, dass die Injektion von MSC in die geschädigte, atrophierte Tränendrüse zu einer signifikanten Geweberegeneration dieser geführt hat. Im Einzelnen sah man, dass die Anzahl vitaler Azini zugenommen hat, sowie das das Tränendrüsengewicht nach einer Atrophie-bedingten Degeneration ebenfalls wieder zugenommen hat. Die Tränenproduktion ist gestiegen, was auch anhand eines Schirmer-Tests festgestellt werden konnte.

1.5. Zielsetzung und Arbeitshypothese

Anhand der oben beschriebenen Eigenschaften von MSCs lässt sich zusammenfassen, dass sie eine regenerative und antiinflammatorische Wirkung haben und auch eine potenzielle Behandlungsoption beim trockenen Auge darstellen könnten. Diese wäre dann im Gegensatz zu den aktuellen genutzten Therapieansätzen kurativ anstatt symptomatisch ausgelegt.

Nach der Abwägung der Vor- und Nachteile von MSCs sowie in Anbetracht der bereits erbrachten Erkenntnisse auf diesem Gebiet scheinen die Erfolgschancen für diese Therapie vielversprechend zu sein.

Die Arbeitshypothese für die folgende Promotionsarbeit kann also wie folgt formuliert werden. Die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen in eine zuvor geschädigte Tränendrüse zeigt eine positive therapeutische Wirkung auf die geschädigte Augenoberfläche.

2. Material und Methoden: Material

Medikament	Wirkstoff	Firma/Hersteller
Ketamin 10%	Ketamin	Medistar Arzneimittelvertrieb
Injektionslösung		GmbH, Ascheberg, Deutschland
Rompun 2% Injektionslösung	Xylazinhydrochlorid	Bayer AG, Leverkusen,
		Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Natriumchlorid 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg
mit NaCl 0,9%		von der Höhe, Deutschland
Isofluran-Piramal	Isofluran	Piramal Healthcare UK Ltd,
Anästhetikum		Morpeth, UK
Gent-Ophthal Augensalbe	Gentamicin-Sulfat 5mg/g	Dr. Robert Winzer Pharma
		GmbH, Berlin, Deutschland
Bepanthen Augen- und	Dexpanthenol 5%	Bayer AG, Leverkusen,
Nasensalbe		Deutschland
Tramadolor	Tramadolhydrochlorid	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Buprenorphin	Buprenorphin	Reckitt Benckiser, Slough, UK
Fluoreszein SE Thilo	Fluoreszein-Natrium 1,7 mg/ml	Alcon (Novartis), Genf, Schweiz
Augentropfen		

Tabelle 2.1	: Materialien	für Tierversuche
Tubene 2.1		

Tabelle 2.2: Materialien für die Operationen

Bezeichnung	Hersteller
Silikonfaden	AS ONE Corporation, Osaka, Japan
Resolon 6/0 (Chirurgischer Faden)	Resorba Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland
Sterile Skalpellklinge	Bayha GmbH, Markgröningen, Deutschland
10 μl Spritze (zur MSC Injektion)	Hamilton Company, Reno, NV, USA
27 Gauge Nadel	Hamilton Company, Reno, NV, USA

Tabelle 2.3:	Chemikalien u	und Reagenzien
--------------	---------------	----------------

Bezeichnung	Hersteller/Firma
Demineralisiertes Wasser	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken,
	Deutschland (18880)
70% Ethanol	VWR chemicals Prolabo, Radnor, PA, USA
	(85.825.360)
96% Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
	(713 8041)

99% Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland	
	(701 8071)	
Xylol	VWR chemicals Prolabo, Radnor, PA, USA (28973.363)	
Paraplast Plus (Paraffin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (X881.2)	
Formaldehydlösung 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (P087.1)	
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (T865.3)	
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (X883.2)	
Alcianblau-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (1.01647.0500)	
Periodsäure-Lösung 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (HP00.1)	
Schiffs Reagenz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (X900.2)	
Roti-Histokitt II Einschlussmedium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (T160.2)	
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (9127.1)	
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (3051.4)	
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (3957.1)	
Tris (Trizma base)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (T1503)	
Tris-HCl (Trizma hydrochloride)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (T3253)	
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (1.04095.0250)	
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (X863.2)	
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (8070.1)	
Natriumcitrat (Na₃C6)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (3580.3)	
Mowiol (Polyvinylalkohol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (81381)	
Dulbecco's Phosphate Buffered	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (D8537)	
Saline		
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (P4333)	
Donkey Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (D9663)	
AffiniPure Fab Fragment Donkey	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	
Anti-Mouse IgG (H+L)	(715-007-003)	
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA (D9542)	
Albumin bovine serum	VWR International, Radnor, PA, USA (422351S)	
ABC-HRP-Reagent Kit	Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA (PK-6100)	
DAB-Substrat-Kit	Vector Laboratories, inc., Burlingame, CA, USA (SK-4100)	

Tabelle 2.4: Arbeits- und Verbrauchsm	aterialien
---------------------------------------	------------

Bezeichnung	Hersteller/Firma
Glasbehälter	Simax, Sázava, Tschechien

Plastikbehälter	Vitlab GmbH, Großostheim, Deutschland
15 ml Tubes	Falcon (Corning), Corning, NY, USA
50 ml Tubes	Falcon (Corning), Corning, NY, USA
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Histologische Einbettkassetten	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH,
	Edermünde, Deutschland
Objektträger (Starfrost Advanced	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH,
Adhesive)	Edermünde, Deutschland
R35 Feather Mikrotomklingen	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Deckglas für Fluoreszenzhistologie	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik,
	Emmendingen, Deutschland
Deckglas für Histologie (24 x 50 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH,
	Edermünde, Deutschland
Dako Pen (hydrophobischer Marker)	Dako, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
	(S2002)
Einwegskalpell, No. 11	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
48-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland (83.3923)
Fixogum Montagekleber	Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland

Tabelle 2.5: Primäre Antikörper

Bezeichnung/Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Anti-Cytokeratin 15	Rabbit	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab52816
Anti-p63α	Mouse	1:600	Biorbyt, Cambridge, UK	orb69390
Anti-Ki67	Rabbit	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab16667
Anti-Caspase-3	Rabbit	1:50	Abcam, Cambridge, UK	ab4051
Anti-CD3	Rabbit	1:100	Abcam, Cambridge, UK	ab16669
Anti-CD68	Rabbit	1:300	Abcam, Cambridge, UK	ab125212
Anti-Ly6G	Rat	1:100	R&D Systems, bio-	MAB1037
			techne, Minneapolis,	
			MN, USA	
Anti-CD45R/B220	Mouse	1:75	R&D Systems, bio-	MAB1217
			techne, Minneapolis,	
			MN, USA	
Anti-GFP	Chicken	1:300	Abcam, Cambridge, UK	ab13970

Anti-Nestin	Rabbit	1:200	BioLegend, San Diego,	839801
			CA, USA	
Anti-Mouse IgG (H+L)	Donkey	1:40	Jackson	715-007-003
			ImmunoResearch,	
			West Grove, PA, USA	

Tabelle 2.6.: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung/Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Alexa Fluor 564 (rot)	Donkey	1:400	Jackson	711-585-152
anti-rabbit IgG			ImmunoResearch,	
			West Grove, PA, USA	
Alexa Fluor 488	Donkey	1:400	Jackson	711-545-152
(grün)			ImmunoResearch,	
anti-rabbit IgG			West Grove, PA, USA	
Alexa Fluor 488	Donkey	1:400	Jackson	715-545-150
(grün)			ImmunoResearch,	
anti-mouse IgG			West Grove, PA, USA	
Alexa Fluor 488	Donkey	1:400	Jackson	703-545-155
(grün)			ImmunoResearch,	
anti-chicken IgY			West Grove, PA, USA	
Alexa Fluor 488	Goat	1:400	Invitrogen AG,	A-11006
(grün)			Carlsbad, CA, USA	
anti-rat IgG				

Tabelle 2.7: Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller	Modell/Nummer
Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,	DM4000B
	Deutschland	
Fluoreszenzlampe	Leica Microsystems CMS GmbH,	EL6000
	Wetzlar, Deutschland	
Operationsmikroskop	Carl Zeiss Meditec AG, Oberkochen,	OPMI pico
	Deutschland	

Konfokales Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,	TCS SP8
	Deutschland	
Entwässerungsautomat	Thermo Electron Corporation,	Shandon Citadel 1000
	Waltham, MA, USA	
Einbettautomat	Pathisto GmbH, Garbsen, Deutschland	TPS-1 EVO II
Kühlplatte	Pathisto GmbH, Garbsen, Deutschland	TPS-1 EVO II
Rotationsmikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,	RM2255
	Deutschland	
Wasserbad	Medite Medical GmbH, Burgdorf,	TFB55
	Deutschland	
Heizplatte	Medite Medical GmbH, Burgdorf,	OTS40
	Deutschland	
Kühlplatte	Thermo Electron Corporation,	Shandon Histocentre 3
	Waltham, MA, USA	
Dampfgarer	Braun GmbH, Kronberg im Taunus,	FS 20, Type 3216
	Deutschland	
Spaltlampe (mit Blaulicht)	Keeler Ophthalmic Instruments,	PSL Classic
	Windsor, UK	
Zentrifuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg	D-6020
pH-Meter	VWR International, Radnor, PA, USA	pH 1000 L
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen,	C-MAG HS7
	Deutschland	
Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Barlingen,	РСВ
	Deutschland	

Tabelle 2.8: Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
Leica Application Suite	4.6.1	Leica Microsystems, Wetzlar,
(Fluoreszenz-Mikroskop)		Deutschland
Leica Application Suite X	3.5.2.18963	Leica Microsystems, Wetzlar,
(Konfokales Mikroskop)		Deutschland
Image J	2.0.0-rc-65/1.51u	Wayne Rasband
GraphPad Prism	6.0	La Jolla, California, USA

Tabelle 2.9: Mauszuchtlinien Mauslinie Züchter/Ursprung Angaben Haltungsbedingungen C57Bl6/J Janvier Labs, Le Genest-9-10 Wochen alte - Wasser und Futter ad Saint-Isle, Frankreich Weibchen libitum C57BL/ - 12:12h Hell/Dunkel Zyklus Jackson Laboratory, Bar 8-12 Wochen alte 6-Tg(CAG-Habor, ME, USA Männchen EGFP)1Osb/J

Tabelle 2.10: Puffer

Bezeichnung	Inhalt bzw. Hersteller
PBS (Phosphat-buffered saline):	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA (D8537)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	
TBS (Tris-buffered saline)	10 mM Stammlösung (10x):
	60,5g Tris-Lauge
	87,6g NaCl in Aqua dest.
	pH von 7,5
	Gebrauchslösung (1x):
	1:10 Verdünnung (1xTBS) der Stammlösung mit Aqua dest.
TBS-Tween-20	500µl Tween-20 auf 1L 1xTBS (s. oben)
Citratpuffer	10 mM Citratpuffer-Stammlösung (10x):
	18ml 0,1 M Zitronensäure
	82 ml 0,1 M Natriumcitrat in Aqua dest.
	pH von 6,0

2. Material und Methoden: Methoden

2.1. Tierversuch und Krankheitsmodell

2.1.1 Organisation und Supervision

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen: 84-02.04.2013.A268, Datum: 10.09.2013). Die Durchführung erfolgte in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte durch Frau Dr. Jana Dietrich und meiner Person als Assistenz.

2.1.2. Isolation der mesenchymalen Stammzellen

Die Bereitstellung der primären murinen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) für die Transplantation erfolgte durch Frau Dr. Dietrich. Für die Gewinnung der MSCs wurden 8-12 Wochen alte eGFP-exprimierende männliche Mäuse (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J) verwendet. Je Transplantations-Experiment wurden Tränendrüsen von 10 Mäusen verwendet. Der MSC Phänotyp der isolierten Zellen wurde anhand der minimalen Kriterien nachgewiesen. [59]

2.1.3 Mausmodell: Ductus Ligatur

Für den Versuch wurden 9-10 Wochen alte weibliche Mäuse (C57Bl6/J, Janvier labs) verwendet. Die Tiere wurden für den Eingriff mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert (Ketanest 80mg/kg Körpergewicht, Rompun 7,5mg/kg Körpergewicht) und auf ihre Augenoberfläche wurde Bepanthen Salbe zum Schutz vor dem Austrocknen aufgetragen. Nach einer Desinfektion des Operationsbereiches zwischen Ohr und Auge auf der rechten Seite mit Betaisodona wurde der Bereich rasiert. Die linke Seite blieb unbehandelt als Kontrolle. Die Eröffnung der Haut erfolgte als vertikaler, etwa 1cm langer Hautschnitt zwischen Ohr und Auge mithilfe eines Skalpells und anschließender stumpfer Präparation des Gewebes. Der exkretorische Ductus der extraorbitalen Tränendrüse wurde vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert und mittels eines Silikonschlauches (Silikontube) mit 2 separaten chirurgischer Knoten ligiert (siehe Abb. 2.1).



Abb. 2.1.: Intraoperative Bilder der Ductus Ligatur. Links: freipräparierte murine Tränendrüse (gestrichelt umrandet). Mitte: der murine Tränenductus (gestrichelt umrandet), mit Pinzette untertunnelt. Rechts: der murine Ductus nach der Ligatur (Pfeil zeigt auf den Silikonfaden), links daneben im Bild ist die Tränendrüse zu sehen (gestrichelt umrandet).

Im folgendem wurde die Wunde mit einem nicht-resorbierbarem Faden verschlossen und mit einem topischen Antibiotikum (Gentamicin-Sulfat 5mg/g, Dr. Robert Winzer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) bedeckt. Den Mäusen wurde zusätzlich ein subkutanes Analgetikum injiziert (Buprenorphin: 0,05mg/kg in 100µl) sowie postoperativ für 3 Tage Tramadol (1mg/ml) ins Trinkwasser beigefügt.

Drei Tage nach der Ligatur des Ductus erfolgte dessen Wiedereröffnung und die Transplantation der MSCs in der Versuchsgruppe bzw. die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe. Nach Einleitung der Narkose wurde der Operationsbereich wie zuvor eröffnet und ein horizontal verlaufender Hautschnitt durchgeführt, sodass sich ein "T-Schnitt" vom Verlauf des Ductus bis hin zur Tränendrüse ergab. Die Ductus Ligatur aus der vorhergegangenen Operation wurde freipräpariert und mittels chirurgischer Pinzetten eröffnet.

Eine Hamilton-Spritze (10µl mit einer 27 Gauge Nadel) wurde zunächst zweimal mit sterilem destilliertem Wasser, danach dreimal mit 70% Ethanol und anschließend dreimal mit einer sterilen Kochsalzlösung zur Sterilisation durchgespült. Die MSCs wurden mit der Spritze aufgenommen (2,5 x 10⁵ Zellen in 2µl NaCl pro Maus) und anschließend in die Tränendrüse injiziert. Die Injektion erfolgte mit ca. 1µl/5 sec., um einen Efflux der MSCs zu minimieren.

Die Wunde wurde mit einem nicht-resorbierbaren Faden (6/0) verschlossen und mit einem Lokalantibiotikum bedeckt. Die Analgesie erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die genannten operativen Schritte wurden von Frau Dr. Dietrich und mir gemeinsam durchgeführt, wobei Dr. Dietrich als Erstoperateur fungierte und ich sie als Assistenz unterstützte.



Abb. 2.2: **Schaubild des Tierversuchsaufbaus**. Der exkretorische Ductus der gesunden Tränendrüse (1) wird mit einem Silikonfaden ligiert (2), was zu einem Verlust von funktionellem Tränendrüsengewebe führt. Nach der Eröffnung der Ligatur (3) kommt es zu einer partiellen Regeneration des Tränendrüsengewebes. Es wurden MSCs (bzw. NaCl in der Kontrollgruppe) in die rechte Tränendrüse injiziert (4).

2.1.4 Probenentnahme und Versuchsaufbau

Die Gewinnung der histologischen Proben erfolgte 5 Minuten nach Injektion (Tag 0) sowie 5 und 21 Tage nach Widereröffnung der Ligatur und Injektion der MSC/Kochsalzlösung. Die Tötung wurde mittels zervikaler Dislokation nach einer Betäubung mit Isofluran durchgeführt.

Die Anzahl der Tiere pro Zeitpunkt, bezogen auf Injektionsart (MSC oder NaCl) beträgt 12 Tiere. Davon wurden je 6 Tiere für die Paraffinhistologie verwendet und 6 Tiere für die *Whole Mount Staining*. Für die Fluoreszein Färbung hingegen wurden alle 12 Tiere der Gruppe einbezogen. In der NaCl Od Gruppe befinden sich nur 11 Mäuse sind, weil eine Maus vor Beginn der Versuchsreihe gestorben ist.

	NaCl (Kontrolle)	MSC (Behandlung)
0 Tage	11 Tiere	12 Tiere
5 Tage	12 Tiere	12 Tiere
21 Tage	12 Tiere	12 Tiere
Kontrolle (Wildtyp)	12 Tiere	

Tabelle 2.11.: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen (MSC vs. NaCl).

2.2. Fluoreszein Färbung

Zur Evaluation von oberflächlichen Schäden der Epithelzellen wurden 5µl Fluoreszein mithilfe einer Eppendorf-Pipette vorsichtig auf die Augenoberfläche appliziert. Der Überschuss wurde mit PBS ausgespült und im Lidwinkel aufgefangen.

Bei Betrachtung unter Blaulicht (494-497nm Wellenlänge) mithilfe einer Spaltlampe erscheinen auf diese Weise Epitheldefekte auf der murinen Augenoberfläche gelb-grünlich, sodass eine Evaluation mithilfe der *Oxford Grading Scale* möglich ist (siehe Abb.1.2). Es wurden stets beide

Augen betrachtet, wobei die linke Seite als unbehandelte Kontrollseite diente [60]. Die Fluoreszein-Färbung wurde bei allen Tieren an den Tagen 0, 5 und 21 durchgeführt.

PANEL	GRADE	CRITERIA	DOT COUNT	LOG	VERBAL DESCRIPTOR
	0	Equal to or less than panel A	1	0	Absent
B	1	Equal to or less than panel B, greater than A	10	1.0	Minimal
\sim	II	Equal to or less than panel C, greater than B	32	1.5	Mild
	ш	Equal to or less than panel D, greater than C	100	2.0	Moderate
	IV	Equal to or less than panel E, greater than D	316	2.5	Marked
>E	v	Greater than panel E	>316	>2.5	Severe

Abb.2.3: Oxford Grading Scale zur Klassifikation von Epithelschäden auf der Augenoberfläche nach Anwendung von Fluoreszein-Augentropfen. [60]

2.3. Histologie an Paraffinschnitten

2.3.1. Gewinnung von histologischen Proben

Für die Paraffinhistologie wurden Mausaugen samt Konjunktiva benötigt. Dafür wurde das Hautgewebe am temporalen Lidwinkel im Abstand von 1-2 mm zum Auge eröffnet und mit einer kleinen Prärationsschere entlang der Lider in Richtung nasaler Augenwinkel freipräpariert. Nach einer Anhebung der Lidhaut am temporalen Augenwinkel erfolgte die Exzision des Augenbulbus aus der Orbitahöhle. Zur späteren Orientierung während des Einbettens wurden die Fellhaare zusätzlich am nasalen Augenwinkel getrimmt.

Die entnommenen Augen samt angrenzender Konjunktiva wurden über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend eingebettet. Dazu erfolgte die Dehydratation der Proben in einen Entwässerungsautomaten (45 Minuten in 70% Ethanol, 120 Minuten in 90% Ethanol, je 135, 190 und 100 Minuten in 100% Ethanol, anschließend je 75 und 60 Minuten in Xylol und daraufhin je 90 und 180 Minuten in einem Paraffinbad). Es erfolgte anschließend die Einbettung in Paraffinblöcken, bei der immer auf eine gleiche Ausrichtung des Auges geachtet wurde.

Die Proben wurden an einem Rotationsmikrotom mit einer Schichtdicke von 4,5µm geschnitten und über Nacht in einem Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Bei HE- und PAS-Färbungen wurden zur besseren statistischen Vergleichbarkeit je 9 möglichst zentrale Schnitte pro Auge verwendet, bei den immunhistologischen Methoden je 3 Schnitte pro Auge.

2.3.2 Hämatoxylin-/Eosin Färbung

Zur Beurteilung der kornealen Epithelzelldicke und der Anzahl von epithelialen Zellschichten wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proben anschließend an eine Deparaffinierung und eine absteigende Alkoholreihe zur Rehydration 5 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer und 3 Minuten in Eosin inkubiert. Auf diese Weise werden die sauren Zellbestandteile (Zellkern, Ribosomen etc.) blau und die basischen (Zytoplasma, Kollagen etc.) rot angefärbt. Es erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung.

Es wurden am Mikroskop Aufnahmen von der Kornea in der 100-fachen Vergrößerung angefertigt und im Betriebsprogramm des Mikroskops (Leica Application Suite) zu einem großen Übersichtsbild der Kornea zusammengefügt.

Zur besseren Orientierung und Vergleichbarkeit der Messdaten über alle Proben hinweg wurde die Kornea in 5 Messpunkte unterteilt, wobei Messpunkt 1 und 5 den limbalen Regionen entsprechen und Punkt 3 die Mitte der Kornea in der gegebenen Aufnahme darstellt. Die Punkte 2 und 4 liegen demnach je mittig zwischen Limbus und Zentrum/Mitte (siehe Abb.1.3).



Abb. 2.4: **Messpunkte der Augenoberfläche**. 1 und 5 entsprechen hierbei dem Limbus, während Messpunkt 3 die Mitte repräsentiert. Messpunkte 2 und 4 sind demnach mittig zwischen Limbus und Korneamitte gelegen.

An diesen genannten Messpunkten wurde mithilfe der Software ImageJ die Epithelzelldicke über alle Korneae hinweg vermessen. Die Anzahl der Epithelzellschichten wurde ebenfalls an den genannten Messpunkten manuell ausgezählt. Es wurden je 9 Schnitte pro Tier in der 40-fachen Vergrößerung ausgewertet.

2.3.3. PAS-Färbung

Zur Darstellung der konjunktivalen Becherzellen wurde eine PAS-Färbung (Periodic acid – Schiff Reaktion) durchgeführt.

Nach einer Deparaffinierung und einer Rehydration mit einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Paraffinschnitte für 4 Minuten in einer Alcianblaulösung inkubiert. Daraufhin erfolgten für 10 Minuten eine Inkubationszeit in einer Periodsäure-Lösung (0,5%) und für 15 Minuten in Schiffs Reagenz. Nach einer 20-sekündigen Gegenfärbung in Hämatoxylin nach Mayer wurden die Schnitte abschließend in einer aufsteigende Alkoholreihe dehydriert.

Pro untersuchtes Auge wurden 9 Schnitte verwendet, die Auszählung der Becherzellen erfolgte pro Lidseite in einer Einstellung in 20-facher Vergrößerung. Anschließend wurde der Mittelwert der 9 Schnitte ermittelt.

2.3.4. Immunhistologie

2.3.4.1 Durchführung der Färbung mit Fluoreszenz-basierten sekundären Antikörpern

Für die Immunhistologie wurden die Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in einer 10mM Citratpuffer-Lösung (pH 6,0) für 35 Minuten in einem Garkocher zur Demaskierung des Epitops für eine optimale Bindung des Antikörpers erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,15% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Die Proben wurden für je 3 x 5 Minuten in TBS-Tween-20 gewaschen, bevor sie in 5% Eselserum (für anti-Caspase-3) und 5% Eselserum mit 0,25% BSA (für anti-CK15, anti-p63α und anti-Ki67) geblockt wurden, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu minimieren. Die Inkubationszeit betrug hierbei 45 Minuten, ausgenommen Ki67 (20 Minuten). Bei Antikörpern, die in Mäusen produziert wurden (anti-p63α), wurde zusätzlich eine *"Mouse-on-Mouse"* Blockierung mit einem Anti-Mouse F(ab) Fragment für 60 Minuten durchgeführt (1:40 in 1xTBS).

Nach 3 Waschschritten für je 5 Minuten mit 1xTBS-Tween-20 wurden die Proben mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C in 2% Eselserum inkubiert (Konzentrationen s. Tab.1.5).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 1 x 5 Minuten und 2 x 10 Minuten in 1x-TBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen sekundären Antikörper in 1x-TBS verdünnt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde mit TBS 3 x 5 Minuten lang ausgewaschen. Bei Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden die Schnitte zu diesem Zeitpunkt mit DAPI-haltigem Mowiol eingedeckt. Bei Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte anschließend die Entwicklung.

Die Auszählung der positiven Zellen erfolgte anschließend an 3 Schnitten je Auge. Anschließend wurde der Mittelwert pro Auge berechnet.

2.3.4.2. Durchführung der Färbung mit DAB-basierten sekundären Antikörpern

Zunächst wurden die Proben in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in einer 10mM Citratpuffer-Lösung (pH 6,0) für 35 Minuten in einem Garkocher erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,15% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Die Proben wurden daraufhin 3 x 5 Minuten in TBS-Tween-20 gewaschen und anschließend mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Waschphase mit TBS-Tween-20 (3 x 5 Minuten) wurden die Schnitte mit 25% Pferdeserum TBS für 45 Minuten geblockt. Nach einer Waschzeit von 3 x 5 Minuten mit 1xTBS-Tween-20 wurden die Proben mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C in 2% Eselserum inkubiert (Konzentrationen s. Tab. 1.5).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 1 x 5 Minuten und 2 x 10 Minuten in 1x-TBS gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper in 1x-TBS verdünnt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend wieder 3 x 5 Minuten in TBS gewaschen und mit einem HRP-haltigem (engl. *Horse-raddish peroxidase*) ABC-Reagenz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Waschphase von 3 x 5 Minuten mit TBS-Tween wurden die Schnitte unter Sichtkontrolle mit DAB als Substrat für die Meerrettichperoxidase entwickelt und die Proben anschließend für 5 Minuten mittels Hämatoxylin gegengefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gewaschen und mit Mowiol + DAPI eingedeckt.

2.3.4.3 Evaluation der Färbung

Die histologischen Schnitte wurden an einem Durchlichtmikroskop inklusive Fluoreszenz ausgewertet. Dabei dienen die Antikörper gegen CK15 und p63α zur Beurteilung der Anzahl der Stammzellen auf der Augenoberfläche. Bei Antikörpern gegen Ki67 und Caspase-3 sowie CD3, CD68, Ly6G und B220 wurden die positiven Zellen manuell ausgezählt und je nach topographischer Lage (Kornea, Konjunktiva) statistisch gegenübergestellt.

2.4. Immunhistologie an Whole Mounts der Kornea

2.4.1. Prinzip

Zur Detektion von MSCs auf der kornealen Oberfläche wurde die Methode der immunhistochemischen Färbung an einem Whole Mount Modell der Kornea durchgeführt, sodass alle MSCs, die sich auf der Augenoberfläche befinden, detektiert werden. Somit soll beurteilt werden, ob in die Tränendrüse transplantierte MSCs eventuell auf die Augenoberfläche gelangen können (bspw. mit dem Tränenfilm) um dort auf der Oberfläche Ihre Wirkung zu entfalten.

Die MSCs wurden anhand des intermediären Filamentproteins Nestin nachgewiesen. Die zusätzliche Detektion von GFP erlaubte eine Differenzierung der MSC-Stammzellen nach endogenem (Nestin-positiv) und exogenem (GFP-positiv) Ursprung.

2.4.2 Durchführung der Färbung

Der Augenbulbus der Mäuse wurde hierbei ohne Konjunktiva entnommen und in PBS überführt. Unter einem Mikroskop wurde das Auge anschließend äquatorial eröffnet und die Kornea wurde als Halbkugel entnommen. Da die Kornea eine stark sphärische Form hat, wurden vier Schnitte eingefügt, um später eine plane Fixierung auf dem Objektträger zu gewährleisten (siehe Abb. 1.4).

Die Korneae wurden in 4% PFA für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 3 x 5 Minuten mit 1xTBS gewaschen. Es folgte eine Permeabilisierung in 0,15% Triton-X-100 in PBS für 10 Minuten. Nach erneuten Waschschritten von 3 x 10 Minuten wurden die Proben für 45 Minuten mit 5% Eselserum blockiert. Es folgte wieder ein Waschschritt für 3 x 15 Minuten in 1xTBS und anschließend eine Inkubation mit den primären Antikörpern (Anti-Nestin, Anti-GFP) in 2% Eselserum über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Proben nach einer Waschzeit von 3 x 15 Minuten für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper in 1x-TBS verdünnt inkubiert. Anschließend wurden die Korneae mit 1x-TBS 3 x 15 Minuten gewaschen und mit Mowiol + DAPI eingedeckt. Für die Fixierung auf dem Objektträger wurde zunächst mit Fixogum ein kreisförmiger Steg gezeichnet, in diesem Ring wurde die Kornea platziert und unter einem Mikroskop als eine plane Fläche aufgespannt. Das Deckglas wurde einen Tag später mit einem klaren Nagellack an den Rändern umrandet, sodass keine Luft von außen eingezogen werden kann.



Abb.2.5.: Herstellung des Whole Mount Modells der murinen Kornea. Der Mausbulbus wird enukleiert und die Kornea am Stück gewonnen. Die konvexe Form wird in eine plane überführt, indem man die Seiten der Kornea ähnlich der Abbildung einschneidet und die Kornea auf einem Objektträger entfaltet.

2.4.3 Auswertung der Färbung

Die Betrachtung der *Wohle Mounts* erfolgte am konfokalen Mikroskop, wobei die GFP- und Nestin-positiven Zellen manuell gezählt wurden. Es wurden hierbei pro Kornea je 10 Gesichtsfelder in einem zentralen Bereich und in einem peripheren Bereich in der 200-fachen Vergrößerung evaluiert und die Zellen ausgezählt.

2.5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse und Erstellung von Graphen wurde die Software GraphPad Prism 6 (La Jolla, California) verwendet. Die statistische Analyse wurde mittels oneway ANOVA gefolgt von einem anschließendem Dunnet-Post-Hoc-Test durchgeführt. Unterschiede ab einem Wert von $p \le 0.05$ wurden als signifikant betrachtet.

In der graphischen Abbildung der Ergebnisse wurden die Signifikanzen mittels Symbole gekennzeichnet, wobei "*" und "#" für p \leq 0.05, "**" und "##" für p \leq 0.01, "***" und "###" für p \leq 0.001 sowie "****" und "####" für p \leq 0.0001 steht. Hierbei steht "*" stellvertretend für einen Vergleich mit der Wildtyp-Kontroll-Gruppe und "#" für einen Vergleich innerhalb der NaCl/MSC Gruppen.
3. Ergebnisse

3.1. Beurteilung des kornealen Epithels in vivo (Fluoreszein)

Bei der Betrachtung beider Augen einer Maus nach der Applikation von Fluoreszein wurde die Schädigung der Augenoberfläche sichtbar und mittels der *Oxford Grading Scale* (s. Material und Methoden, im Folgenden: OGS) evaluiert. Das rechte Auge fungierte hierbei als Versuchsseite, da die Ductus Ligatur ausschließlich rechts durchgeführt wurde. Das linke Auge bleib somit unbehandelt und diente als Kontrollseite.

Am rechten Auge ließen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen, im Durchschnitt zeigte sich eine leichte Anfärbung der Augenoberfläche mit einem OGS von 1,28 (\pm 0,71).

Am linken Auge ließ sich ebenfalls keine relevante signifikante Schädigung feststellen, im Durchschnitt ließ sich ein OGS von 1,1 (\pm 0,71) beobachten.



Abb.3.1: **Fluoreszein-Färbung beider Mausaugen und Auswertung mittels** *Oxford Grading Scale* (OGS). Hierbei ist das rechte Auge operiert worden, das linke Auge blieb unbehandelt als Kontrollauge (Kontrolle).

3.2. Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin des kornealen Epithels erfolgte zum Zweck der Vermessung der Schichtdicke des kornealen Epithels und Auszählung der epithelialen Zellschichten an definierten Messpunkten (s. Material und Methoden).

	NaCl	MSC
0d		



Abb.3.2: Repräsentative Abbildungen der Kornea mittels Hämatoxylin/Eosin Färbung (rechtes Mausauge), hier als zentraler Bereich in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 μm.

3.2.1. Auszählung der Epithelzellschichten

Bei der Auszählung der Epithelzellschichten zeigte sich in der MSC-Gruppe am Tag 5 am Messpunkt 5 einen signifikanten Unterschied zu der unbehandelten Kontrollgruppe ($3,2 \pm 0,25$ Schichten (MSC 5d) vs. $4,0 \pm 0,35$ Schichten (Kontrolle), p< 0,0001).

Innerhalb der NaCl-Gruppe sah man am Messpunkt 4 zum Zeitpunkt 0d eine signifikant höhere Anzahl von Epithelzellschichten als an 5d und 21d (7,64 \pm 0,53 Schichten (0d) vs. 6,89 \pm 0,2 Schichten (5d), p = 0,0006 und vs. 7,02 \pm 0,28 Schichten (21d), p = 0,0078).

Betrachtet man die MSC-Gruppen, so erkennt man eine gemeinsame Dynamik: es gibt einen Abfall der Epithelzellschichten von 0d zu 5d, danach erfolgt ein Anstieg von 5d zu 21d. Dies ist zu beobachten an Messpunkt 1 (Abfall von 4,52 \pm 0,32 Schichten (MSC 0d) vs. 3,98 \pm 0,41 Schichten (MSC 5d), p= 0,0070, dann Anstieg auf 4,43 \pm 0,28 (MSC 21d), p= 0,0432), an Messpunkt 2 (Abfall von 7,69 \pm 0,24 Schichten (MSC 0d) vs. 7,15 \pm 0,24 Schichten (MSC 5d), p=0,0310), dann Anstieg auf 7,8 \pm 0,43 Schichten(MSC 21d), p= 0,0044), an Messpunkt 3 (Abfall von 8,43 \pm 0,36 Schichten (MSC 0d) vs. 7,67 \pm 0,08 Schichten (MSC 5d), p=0,0003, daraufhin Anstieg auf 8,43 \pm 0,35 Schichten (MSC 21d), p=0,0003) und an Messpunkt 5 (Abfall von 3,98 Schichten \pm 0,34 (MSC 0d) vs. 3,2 \pm 0,25 Schichten (MSC 5d), p< 0,0001, daraufhin Anstieg auf 4,18 \pm 0,19 Schichten (MSC 21d), p < 0,0001).

Vergleicht man nun abschließend die NaCl- und die MSC-Gruppe insgesamt miteinander, so fallen an Messpunkt 3 und 5 signifikante Unterschiede zwischen diesen an gleichen Zeitpunkten auf. Am Messpunkt 3 erkennt man, dass es in der NaCl 0d Gruppe signifikant weniger epitheliale Zellschichten gibt als in der zeitgleichen MSC-Gruppe (7,91 \pm 0,4 Schichten vs. 8,43 \pm 0,36 Schichten, p=0,0322). An Messpunkt 5 ist zum einen auffällig, dass an Tag 5 in der NaCl-Gruppe signifikant mehr Schichten zu verzeichnen sind als am gleichen Zeitpunkt in der MSC-Gruppe (3,89 \pm 0,19 Schichten vs. 3,2 \pm 0,25 Schichten, p= 0,0002). Dies zeigte sich ebenfalls bei dem Vergleich unbehandelter Kontrollgruppe gegen MSCs. Zum anderen gibt es aber auch an Tag 21 in der NaCl-Gruppe signifikant weniger Schichten als am vergleichbaren Zeitpunkt in der MSC-Gruppe (3,61 \pm 0,33 Schichten vs. 4,19 \pm 0,19 Schichten, p=0,0023).











Abb. 3.3.: Anzahl der Epithelzellschichten bezogen auf die 5 definierten Messpunkte (s. Material und Methoden).

3.2.2 Messung der Epithelzelldicke

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe liegt nur an Messpunkt 4 ein signifikanter Unterschied in der NaCl-Gruppe an Od (32,29 \pm 1,37 μ m vs. 35,53 \pm 3,66 μ m, p=0,0039) vor. An Tag 5 zeigte sich dagegen in nahezu jeder NaCl-Gruppe eine signifikant kleinere Epithelzelldicke als in der Kontrollgruppe, nämlich am Messpunkt 1 (17,76 \pm 1,47 μ m vs. 14,55 \pm 1,21 μ m, p=0,0007), an Messpunkt 2 (32,42 \pm 1,65 μ m vs. 28,40 \pm 1,83 μ m, p < 0,0001), an Messpunkt 3 (35,23 \pm 1,2 μ m vs. 27,72 \pm 0,66 μ m, p < 0,0001) und Messpunkt 4 (32,29 \pm 1,37 μ m vs. 25,08 \pm 0,68 μ m, p < 0,0001). Auch an Tag 21 zeigte sich an 3 Messpunkten eine signifikant geringere Dicke als in der Kontrollgruppe, dazu gehören Messpunkt 1 (17,76 \pm 1,47 μ m vs. 15,07 \pm 0,98 μ m, p = 0,0069), Messpunkt 3 (35,23 \pm 1,2 μ m vs. 29,43 \pm 1,32 μ m, p < 0,0001) und Messpunkt 4 (32,29 \pm 1,37 μ m vs. 27,91 \pm 0,89 μ m, p < 0,0001).

Vergleicht man nun alle NaCl-Gruppen untereinander, so stellt man in vielen einen deutlichen Abfall der Zelldicke von 0d zu 5d. Diese Dynamik kann man am Messpunkt 1 (17,38 \pm 2,84 µm vs. 14,55 \pm 1,2 µm, p = 0,0037), Messpunkt 2 (35,19 \pm 2,08 µm vs. 28,40 \pm 1,83 µm, p < 0,0001), Messpunkt 3 (34,04 \pm 1,1 µm vs. 27,72 \pm 0,66 µm, p < 0,0001) und Messpunkt 4 (35,53 \pm 3,66 µm vs. 25,08 \pm 0,68 µm, p < 0,0001). Wenn man jedoch den weiteren Verlauf betrachtet, so kann man später einen Anstieg der Zelldicke von 5d zu 21d innerhalb der NaCl-Gruppen beobachten, um genauer zu sein am Messpunkt 2 (28,40 \pm 1,83 µm vs. 31,48 \pm 0,94 µm, p= 0,0036), Messpunkt 3 (27,72 \pm 0,66 µm vs. 29,43 \pm 1,32 µm, p = 0,0087) und am Messpunkt 4 (25,08 \pm 0,68 µm vs. 27,91 \pm 0,89 µm, p = 0,0179).

Wenn man die Kontrollgruppe den MSC-Gruppen vergleichend gegenüberstellt, so stellt man fest, dass in diesem überwiegend eine geringere Dicke zu verzeichnen ist als in der Kontrollgruppe. Für die MSC-Gruppe an 0d ist es zu beobachten am Messpunkt 1 (17,76 \pm 1,47 µm vs. 13,31 \pm 1,03 µm, p < 0,0001), Messpunkt 2 (32,42 \pm 1,65 µm vs. 26,79 \pm 0,99 µm, p < 0,0001), Messpunkt 3 (35,23 \pm 1,2 µm vs. 28,53 \pm 0,52 µm, p < 0,0001) und Messpunkt 4 (32,29 \pm 1,37 µm vs. 26,78 \pm 1,05 µm, p < 0,0001). An Tag 5 in der MSC-Gruppe ist es an allen Messpunkten zu beobachten, genauer gesagt: an Messpunkt 1 (17,76 \pm 1,47 µm vs. 11,71 \pm 0,89 µm, p < 0,0001), Messpunkt 2 (32,42 \pm 1,65 µm vs.

27,01 ± 1,92 µm, p < 0,0001), Messpunkt 3 (35,23 ± 1,2 µm vs. 27,15 ± 0,83 µm, p < 0,0001), Messpunkt 4 (32,29 ± 1,37 µm vs. 24,91 ± 1,02 µm, p < 0,0001) und Messpunkt 5 (12,61 ± 1,52 µm vs. 8,348 ± 0,85 µm, p < 0,0001). Am Tag 21 gibt es nur 2 MSC-Gruppen, die in ihrer Dicke signifikant dünner sind als die Kontrollgruppe, nämlich am Messpunkt 3 (35,23 ± 1,2 µm vs. 29,99 ± 1,01 µm, p < 0,0001) und Messpunkt 4 (32,29 ± 1,37 µm vs. 28,67 ± 1,61 µm, p = 0,0009).

Die Zunahme der Dicke von 5d zu 21d ist an allen 5 Messpunkten innerhalb der MSC-Gruppen signifikant, genauer gesagt am Messpunkt 1 (11,71 0,89 μ m vs. 16,71 \pm 1,23 μ m, p < 0,0001), Messpunkt 2 (27,01 \pm 1,92 μ m vs. 31,87 \pm 1,71 μ m, p < 0,0001), Messpunkt 3 (27,15 \pm 0,83 μ m vs. 29,99 \pm 1,01 μ m, p < 0,0001), Messpunkt 4 (24,91 μ m vs. 28,67 \pm 3,76 μ m, p = 0,0005) und Messpunkt 5 (8,348 \pm 0,85 μ m vs. 11,97 \pm 1,17 μ m, p < 0,0001).

Vergleicht man abschließend die NaCl- mit der MSC-Gruppe, so kann man feststellen, dass es an Tag 0 in den NaCl-Gruppen eine überwiegend höhere Dicke gibt als in der MSC-Gruppe. Das kann man am Messpunkt 1 (17,38 \pm 2,84 µm vs. 13,31 \pm 1,03µm, p < 0,0001), Messpunkt 2 (35,19 \pm 2,08µm vs. 26,79 \pm 0,99 µm, p < 0,0001), Messpunkt 3 (34,04 \pm 1,1 µm vs. 28,53 \pm 0,52 µm, p < 0,0001), Messpunkt 4 (35,53 \pm 3,67 µm vs. 26,78 \pm 1,05 µm, p < 0,0001) und Messpunkt 5 (12,83 \pm 1,23 µm vs. 9,508 \pm 0,91 µm), p < 0,0001). An Tag 5 sieht man, dass es nur am Messpunkt 1 (14,55 \pm 1,21 µm vs. 11,71 \pm 0,89 µm, p = 0,0035) und Messpunkt 5 (11,91 \pm 1,54 µm vs. 8,3 \pm 0,85 µm, p < 0,0001) eine signifikant höhere Dicke in der NaCl-Gruppe als in der MSC-Gruppe gibt. Am Tag 21 gibt es zwischen der NaCl- und der MSC-Gruppe keine signifikanten Unterschiede.









3.3. PAS Färbung (Muzinbildende Becherzellen der Konjunktiva)

Zur Auszählung der muzinbildenden Becherzellen der Konjunktiva wurde eine PAS-Färbung durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse als Summe der Becherzellen auf einem Schnitt eines Auges dargestellt (also beide Lidseiten).



Abb. 3.5.: Repräsentative Abbildungen der PAS-Färbung der Mauskornea, hier als fornixnaher Bereich. Linksseitig im Bild ist jeweils die Konjunktiva abgebildet. Die Becherzellen erscheinen im Bild dunkelblau. Skala = 100 μm, 200-fache Vergrößerung.

Die Kontrollgruppe weist im Schnitt die höchste Anzahl von Becherzellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf mit 103,0 \pm 4,24 Zellen vs. NaCl Tag 5 (71,48 \pm 4,21 Zellen, p < 0,0001), MSC Tag 0 (82,94 \pm 6,28 Zellen, p < 0,0001), MSC Tag 5 (75,93 \pm 5,24 Zellen, p < 0,0001) und MSC Tag 21 (74,15 \pm 5,4 Zellen, p < 0,0001). Innerhalb der NaCl-Gruppe kann man zunächst einen Abfall der PAS-positiven Becherzellen von Zeitpunkt 0 zum Tag 5 beobachten (101,6 \pm 4,11 vs. 71,48 \pm 4,21 Zellen, p < 0,0001), gefolgt von einem signifikanten Anstieg von Tag 5 zum Tag 21 (71,48 \pm 4,21 vs. 98,16 \pm 4,33 Zellen, p < 0,0001).

Innerhalb der MSC-Gruppen sieht man einen stetigen Abfall der Becherzellen von 0d über 5d zu 21d, wobei der Abfall von 0d zu 5d nicht signifikant ist. Die MSC-Gruppe hat an Tag 0 signifikant mehr Becherzellen als an Tag 21 (82,94 \pm 6,28 vs. 74,15 \pm 5,4 Zellen, p = 0,0059).

Im Vergleich zwischen der NaCl- und der MSC-Gruppe kann man feststellen, dass es am Tag 0 in der NaCl-Gruppe signifikant weniger PAS-positive Zellen gab als zum gleichen Zeitpunkt in der MSC-Gruppe (101,6 \pm 4,11 vs. 82,94 \pm 6,28 Zellen, p < 0,0001). Gleiches gilt an Tag 21 (98,16 \pm 4,33 vs. 74,15 \pm 5,4 Zellen, p < 0,0001).



Abb. 3.6.: Auswertung der Zählung von PAS-positiven Becherzellen.

3.4.1 Oberflächenmorphologie

Zur Darstellung der Oberflächenmorphologie und somit zur Untersuchung der intakten Epithelzellen und Stammzellen wurden Fluoreszenz-basierte Antikörper gegen CK15 (intakte Epithelzellen) und p63 α (Stammzell-Marker) verwendet.

CK15-positive Zellen waren besonders ausgeprägt in der Konjunktiva dargestellt, wobei die Farbintensität von apikal nach basal abnimmt. In der Kornea waren CK15-positiv angefärbte Zellen nur an der apikal gelegenen Epithelschicht zu detektieren.

Der Marker p 63α zeigte sowohl in der Kornea als auch in der Konjunktiva eher basal im Epithel eine positive Färbung. Zudem war dieser Marker auch stark in nicht untersuchten Gewebebereichen vertreten, z.B. kleineren Drüsen.



Abb. 3.7: Repräsentative Darstellung der Kornea (links im Bild) und der Konjunktiva (rechts im Bild) in 400-facher Vergrößerung. Der CK15 Marker ist hierbei mit einem roten und der p63α Marker mit einem grünen sekundären Antikörper gekoppelt. Skala 50 μm.

3.4.2. Proliferation

Für die quantitative Auszählung der proliferierenden Zellen wurde der Fluoreszenz-basierte Antikörper gegen Ki67 verwendet. Positive Zellen wurden voneinander getrennt auf der Konjunktiva und der Kornea (genauer: kornealem Epithel) ausgezählt.



Abb. 3.8.: Repräsentative Darstellung von Ki67-positiven Zellen auf der Kornea (links im Bild) und der Konjunktiva (rechts im Bild) in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 μm.

Betrachtet man zunächst nur die Kornea, so stellt man fest, dass es in der NaCl-Gruppe an Od signifikant mehr positive Zellen gibt als in der Kontrollgruppe ($84,33 \pm 9,66$ vs. $132,4 \pm 7,64$ Zellen, p = 0,0206). Bei der Betrachtung von der NaCl-Gruppe kann man eine Dynamik feststellen, es gibt einen stetigen Abfall Ki67-positiver Zellen von Od zu 5d zu 21d, wobei nur der Vergleich zwischen Od und 21d signifikant ist ($132,4 \pm 7,64$ vs. $79,33 \pm 0,94$ Zellen, p= 0,0121). Sieht man sich die MSC-Gruppen auf der Kornea an, so ist ein Anstieg von Ki67-positiven Zellen von Od zu 5d zu 5d zu beobachten, welcher jedoch nicht signifikant ist. Bei einem Vergleich zwischen der NaCl- und der MSC-Gruppe stellt man fest, dass es in der NaCl-Gruppe an Tag 0 deutlich mehr positive Zellen gibt als in der MSC-Gruppe ($132,4 \pm 7,64$ vs. $43,17 \pm 5,89$ Zellen, p = 0,0005).

Bei der Betrachtung der Konjunktiva sieht man, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und allen anderen Gruppen gibt. Bei der isolierten Betrachtung der NaCl-Gruppe sieht man einen konstanten Abfall der Ki67-positiven Zellen von Od zu 5d zu 21, jedoch allesamt nicht signifikant. Innerhalb der MSC-Gruppen ist es andersherum, es gibt einen Anstieg zwischen der 5d und der 21d Gruppe, jedoch gibt es auch innerhalb der MSC-Gruppen keine signifikanten Ergebnisse. Wenn man jedoch die NaCl-Gruppen mit den MSC-Gruppen vergleicht, so sieht man, dass die NaCl-Gruppe an Tag 0 signifikant mehr Ki67-positive Zellen hat als in der MSC-Gruppe am gleichen Tag (144,7 \pm 41,82 vs. 72,00 \pm 10,46 Zellen, p= 0,0027).

Wenn man alle Ki67-positiven Zellen betrachtet, also auf der Kornea und der Konjunktiva addiert, bekommt man ein deutlicheres Bild der zuvor in den einzelnen beschriebenen Dynamiken. Zum einen sieht man, dass die NaCl Od Gruppe deutlich mehr Ki67-positiven Zellen hat als in der Kontrollgruppe (267,8 \pm 46,55 vs. 421,7 \pm 25,31 Zellen, p = 0,0431). Zum anderen kann man einen Abfall von 0d zu 5d zu 21d beobachten, jedoch ist auch hier nur der Vergleich zwischen 0d und 21d signifikant (421,7 \pm 25,31 vs. 233,8 \pm 8,01 Zellen, p = 0,0158). Innerhalb der MSC-Gruppen sieht man einen kontinuierlichen Anstieg der positiven Zellen von 0d zu 5d zu 21d, dieser ist jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Wenn man abschließend die NaCl- mit der MSC-Gruppe vergleicht, kann man feststellen, dass es an Tag 0 signifikant mehr positive Zellen gibt als am gleichen Zeitpunkt in der MSC-Gruppe (421,7 \pm 25,31 vs. 187,2 \pm 9,9 Zellen, p = 0,0046).



Abb. 3.9.: Auszählung der Ki67-positiven Zellen.

3.4.3. Apoptose

Es wurden außerdem Caspase-3 positive apoptotische Zellen ausgezählt. Diese wurden, analog zu Ki67, auf dem kornealen Epithel und auf der Konjunktiva gezählt und anschließend zusätzlich als Summe betrachtet.



Abb. 3.10.: Repräsentative Darstellung von Caspase-3-positiven Zellen auf der Kornea (links im Bild) und der Konjunktiva (rechts im Bild) in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 μm.

Auf der Kornea gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Kontrollgruppe, der NaCl-Gruppe an Tag 0 und der MSC-Gruppe an Tag 21 zeigten sich keinerlei positiven Zellen.

Auf der Konjunktiva lagen nur in der NaCl-Gruppe an Tag 21 signifikant mehr Caspase-3 positive Zellen vor als in der Kontrollgruppe ($0,17 \pm 0,17$ vs. $1,21 \pm 0,44$ Zellen, p = 0,0089). Innerhalb der NaCl-Gruppe sah man einen kontinuierlichen Anstieg von Tag 0 zu Tag 21, dieser war jedoch nicht signifikant. Innerhalb der MSC-Gruppe konnte man keine Signifikanzen feststellen. Vergleicht man nun die NaCl- und MSC-Gruppe miteinander, so stellt man fest, dass es in der NaCl-Gruppe an Tag 21 signifikant mehr Caspase-3-positive Zellen gibt als in der MSC-Gruppe am gleichen Tag ($1,21 \pm 0,44$ vs. $0,0 \pm 0,0$ Zellen, p = 0,0020).

Betrachtet man die Caspase-3-positiven Zellen in der Summe, also auf der Kornea und der Konjunktiva zusammen, so konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu der Kontrollgruppe innerhalb der NaCl-Gruppe nur an Tag 5 (0,33 \pm 0,24 vs. 3,25 \pm 0,83 Zellen, p = 0,0020) und Tag 21 (0,33 \pm 0,24 vs. 3,42 \pm 0,59 Zellen, p = 0,0015) signifikant mehr positive Zellen gibt. Innerhalb der NaCl-Gruppe gibt es einen kontinuierlichen Anstieg von Tag 0 zu Tag 5 (0,9 \pm 0,14 vs. 3,25 \pm 0,83 Zellen, p = 0,0073) und dann zu 21 (nicht signifikant). Innerhalb der MSC-Gruppen zeigte sich ein Abfall der Caspase-3-positiven Zellen von Tag 0 zu Tag 5 und daraufhin zu Tag 21. Lediglich der Vergleich von 0d zu 21d ist signifikant (1,75 \pm 0,12 vs. 0,0 \pm 0,0 Zellen, p = 0,0349). Wenn man die NaCl- und die MSC-Gruppe gegenüberstellt, so sind an Tag 5 signifikant mehr Zellen in der NaCl-Gruppe zu verzeichnen als in der MSC-Gruppe (3,25 \pm 0,83 vs. 1,33 \pm 0,24 Zellen, p = 0,0221). Zudem gibt es an Tag 21 in der NaCl-Gruppe ebenfalls mehr Caspase-3-positive Zellen als in der MSC-Gruppe am gleichen Tag (3,42 \pm 0,59 vs. 0,0 \pm 0,0 Zellen, p = 0,0008).



Caspase-3 (Summe)



Abb. 3.11.: Auszählung der Caspase-3-positiven Zellen.

3.4.5. CD3 (T-Zellen)

Zur Evaluation der Inflammationsprozesse auf der Augenoberfläche im Hinblick auf das Vorkommen von T-Zellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen CD3 durchgeführt. Alle CD3 positiven Zellen wurden getrennt nach ihrem Vorkommen auf dem kornealen Epithel, dem kornealen Stroma und der Konjunktiva gezählt.





Abb. 3.12.: CD3-Färbung der Konjunktiva, hier als fornixnaher Bereich in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 μ m.

Auf dem kornealen Epithel ließen sich ausschließlich in der MSC 21d Gruppe positive Zellen auszählen, mit einer durchschnittlichen Anzahl von 0,42 \pm 0,12 Zellen, alle anderen Gruppen wiesen keinerlei positive Zellen auf. Somit ergab sich eine signifikant höhere Anzahl von Zellen als in der Kontrollgruppe, den beiden anderen MSC-Gruppen und den vergleichbare NaCl-Gruppe an Tag 21 (alle Gruppen mit Zellenanzahl von 0,0 \pm 0,0 Zellen, p = 0,0004).

Im kornealen Stroma hingegen, aber auch in anderen Gruppen zeigten sich vereinzelt positive Zellen, diese waren aber allesamt nicht signifikant gegenüber anderen Gruppen erhöht.

Auf der Konjunktiva ließen sich hingegen insgesamt höhere Expression positiver Zellen feststellen. Innerhalb der NaCl-Gruppe war nur in NaCl 5d Gruppe signifikant mehr Zellen als in der Kontrollgruppe zu verzeichnen (0,25 \pm 0,22 vs. 1,5 \pm 1,01 Zellen, p = 0,0137), sonst gab es keine anderen Signifikanzen gegenüber der Kontrolle. Im zeitlichen Verlauf innerhalb der NaCl-Gruppe kann man einen Anstieg der Zellzahl von Tag 0 auf Tag 5 feststellen (0,15 \pm 0,1 vs. 1,5 \pm 1,01 Zellen, p = 0,0069). Danach kommt zu einem Abfall zu Tag 21, welcher jedoch nicht signifikant ist. Innerhalb der MSC-Gruppen auf der Konjunktiva sticht nur die MSC 21d Gruppe als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe hervor (0,25 \pm 0,22 (Kontrolle) vs. 1,42 \pm 0,32 (MSC 21d) p = 0,0241). Sieht man sich nun den Verlauf innerhalb dieser MSC-Gruppen auf der Konjunktiva auf der Konjunktiva an, so stellt man einen geringen Abfall der CD3-positiven Zellen von 0d zu 5d. Dem folgt ein signifikanter Anstieg von 5d zu 21d (0,21 \pm 0,21 vs. 1,42 \pm 0,32 Zellen, p = 0,0182). Wenn man nun abschließend zwischen den NaCl- und der MSC-Gruppe am gleichen Zeitpunkt vergleicht, so sieht man in der NaCl-Gruppe an Tag 5 signifikant mehr positive Zellen als am gleichen Tag in der MSC-Gruppe (1,5 \pm 1,01 vs.0,21 \pm 0,21 Zellen, p = 0,0103).

Am Tag 21 ist es jedoch umgekehrt, hier sind in der NaCl-Gruppe signifikant weniger Zellen als in der MSC-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt (0,29 \pm 0,25 vs. 1,42 \pm 0,32 Zellen, p = 0,0318).

In der Summe betrachtet lässt sich auch hier feststellen, dass im Vergleich zu der Kontrollgruppe die NaCl-Gruppe an Tag 5 (3,08 \pm 0,12 vs. 0,67 \pm 0,71 Zellen, p = 0,0083) und MSC-Gruppe am Tag 21 (3,58 \pm 0,12 vs. 0,67 \pm 0,71 Zellen, p = 0,0028) über die mit Abstand meisten positiven Zellen verfügen. Innerhalb der NaCl-Gruppen kann man beobachten, dass es zunächst zu einem Anstieg von Tag 0 auf Tag 5 kommt (0,50 \pm 0,14 vs. 3,08 \pm 0,12 Zellen, p = 0,0057), und anschließend sinkt die Zellzahl zum 21. Tag signifikant ab (3,08 \pm 0,12 vs. 0,58 \pm 0,59 Zellen, p = 0,0069). Innerhalb der MSC-Gruppen sieht man zunächst einen Abfall der Zellzahl von Tag 0 zu 5 (nicht signifikant), dann jedoch einen Anstieg der CD3-positven Zahlen von Tag 5 auf Tag 21 (0,5 \pm 0,24 vs. 3,58 \pm 0,12 Zellen, p = 0,0069). Darüber hinaus gab es an Tag 0 in der MSC-Gruppe signifikant mehr Zellen als an Tag 21 (1,08 \pm 0,59 vs. 3,58 \pm 0,12 Zellen, p = 0,0069). Vergleicht man die Gruppen untereinander, so sieht man, dass es an Tag 5 in der NaCl-Gruppe deutlich mehr positive Zellen gab als in der MSC-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt (3,08 \pm 0,12 vs. 0,50 \pm 0,24 Zellen, p = 0,0069). An Tag 21 hingegen gab es in der MSC-Gruppe mehr positive Zellen als in der NaCl-Gruppe (3,58 \pm 0,12 vs. 0,58 \pm 0,59 Zellen, p = 0,0029).



CD3 (Summe)



Abb. 3.14: Ergebnisse der Auszählung von CD3-positiven Zellen (T-Zellen) getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, dem kornealem Stroma und der Konjunktiva.

3.4.6. CD68 (Makrophagen)

Die bei Immunantwort beteiligten Makrophagen wurden mittels immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen CD68 evaluiert. Positive Zellen sollten dann anschließend getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, auf dem kornealem Stroma und der Konjunktiva ausgezählt werden.





Abb. 3.15: CD68-Färbung der Konjunktiva, hier als fornixnaher Bereich in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 µm.



Abb. 3.16: Ergebnisse der Auszählung von CD68-positiven Zellen (Makrophagen) getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, dem kornealem Stroma und der Konjunktiva.

Obwohl sich insbesondere in den beiden 5d Gruppen einzelne positive Zellen zählen ließen, waren diese jedoch nicht ausreichend, um als signifikant angesehen zu werden. Rein deskriptiv kann man schildern, dass sowohl in der NaCl- als auch in der MSC-Gruppe es zunächst zu einem Anstieg der CD68-positiven Zellen von Tag 0 zu Tag 5 kam, diesem folgte dann ein Abfall der Zellen zum Tag 21.

3.4.7. Ly6G (Granulozyten)

Um die bei der Immunantwort beteiligten Ly6G-positiven Granulozyten zu beurteilen, wurde ebenfalls eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Positive Zellen wurden dann anschließend getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, auf dem kornealem Stroma und der Konjunktiva ausgezählt.





Abb. 3.17: Ly6G-Färbung der Konjunktiva, hier als fornixnaher Bereich in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 µm.

Auf dem kornealen Epithel sticht die NaCl-Gruppe an Tag 5 durch ihr vergleichsweises hohes Vorkommen an Ly6G-positiven Granulozyten hervor (0,67 \pm 0,24 Zellen). Sie hat somit signifikant mehr positive Zellen als die Kontrollgruppe (0,67 \pm 0,24 vs. 0,0 \pm 0,0 Zellen, p = 0,0479). Es lässt sich zudem eine signifikante Steigerung der Zellzahl von Tag 0 zu Tag 5 in der NaCl-Gruppe beobachten (0,0 \pm 0,0 vs. 0,67 \pm 0,24 Zellen, p = 0,0479).

Im kornealen Stroma ließen sich zwar positive Zellen feststellen, insbesondere in der NaCl-Gruppe an Tag 5 (0,42 \pm 0,35 Zellen), jedoch waren diese nicht signifikant positiv gegenüber anderen Gruppen.

Auf der Konjunktiva hingegen sind bei der NaCl-Gruppe an Tag 5 mit im Schnitt 1,71 \pm 1,02 besonders viele Zellen zu verzeichnen, sie hat signifikant mehr Zellen als die Kontrollgruppe (1,71 \pm 1,02 vs. 0,17 \pm 0,17 Zellen, p = 0,0085). Außerdem kann man auch hier einen Anstieg der Ly6G-positiven Zellen von Tag 0 auf Tag 5 in der NaCl-Gruppe beobachten (0,2 \pm 0,4 vs. 1,71 \pm 1,02 Zellen, p = 0,0104). Dem folgt ein signifikanter Abfall der Zellen von Tag 5 zu Tag 21 (1,71 \pm 1,02 vs. 0,083 \pm 0,17 Zellen, p = 0,005). Innerhalb der MSC-Gruppen auf der Konjunktiva sieht man eine ähnliche Dynamik, diese ist jedoch bei weitem nicht so deutlich ausgeprägt und somit nicht signifikant. Im Vergleich zwischen den Gruppen erkennt man, dass es an Tag 5 in der NaCl-Gruppe deutlich mehr positive Zellen gab als in der MSC-Gruppe am gleichen Tag (1,71 \pm 1,02 vs. 0,46 \pm 0,7 Zellen, p = 0,0457).

Summiert man die Zahlen auf allen drei untersuchten Gewebearten, dann wird der bereits beschriebene Effekt noch deutlicher bestätigt. Hier beträgt die durchschnittliche Anzahl Ly6G-positiver Zellen in der NaCl-Gruppe an Tag 5 nun 4,5 \pm 1,18 Zellen, was signifikant mehr ist als in der Kontrollgruppe (0,33 \pm 0,26 Zellen, p = 0,0024). Der Anstieg der Ly6G-positiven Zellen von Tag 0 zu Tag 5 wird noch signifikanter (0,40 \pm 0,57 vs. 4,5 \pm 1,18 Zellen, p = 0,0026), ebenso wie der folgende Abfall zum Tag 21 (4,5 \pm 1,18 vs. 0,25 \pm 0,35 Zellen, p = 0,0021). Diese ähnliche Dynamik innerhalb der MSC-Gruppen bleibt nicht signifikant. Im Vergleich zwischen den Gruppen gab es in der NaCl-Gruppe an Tag 5 auch mehr Zellen als am gleichen Tag in der MSC-Gruppe (4,5 \pm 1,18 vs. 1,17 \pm 0,47 Zellen, p = 0,0087).



Abb. 3.18: Ergebnisse der Auszählung von Ly6G-positiven Zellen (Granulozyten) getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, dem kornealem Stroma und der Konjunktiva.

3.4.8. B220 (B-Zellen)

Zur Evaluation der bei der Immunantwort beteiligten B-Zellen wurden die murinen Mausoberflächen mit Antikörpern gegen B-220 immunhistologisch gefärbt. Positive Zellen wurden dann auf dem kornealen Epithel, auf dem kornealen Stroma und der Konjunktiva ausgezählt.

	NaCl	MSC
Od		



Abb. 3.19.: B220-Färbung der Konjunktiva, hier als fornixnaher Bereich in 400-facher Vergrößerung. Skala 50 μ m.

Auf der gesamten Kornea, also auf dem kornealen Epithel und im kornealen Stroma ließen sich keine signifikanten Ergebnisse gewinnen.

Auf der Konjunktiva gibt es in der MSC-Gruppe an Tag 5 signifikant weniger Zellen als in der Kontrollgruppe (0,17 \pm 0,19 vs. 1,29 \pm 0,66 Zellen, p = 0,0345). Andere Signifikanzen oder Tendenzen lassen sich nicht beobachten.

In der Summe betrachtet relativiert sich dieses Ergebnis jedoch und es lassen sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.



Abb. 3.20.: Ergebnisse der Auszählung von B220-positiven Zellen (B-Zellen) getrennt nach ihrer Lokalisation auf dem kornealen Epithel, dem kornealem Stroma und der Konjunktiva.

3.5. Detektion von Stammzellen auf der Augenoberfläche

Um Stammzellen auf der Augenoberfläche zu detektieren, wurden die Mauskorneae als *Whole Mount* aufgearbeitet und mit Antikörpern gegen GFP (exogene mesenchymale Stammzellen) und gegen Nestin (endogene mesenchymale Stammzellen) gefärbt. Die Korneae wurden dann in 200facher Vergrößerung im konfokalen Mikroskop jeweils an 10 zentralen und 10 peripheren Bereichen einer Kornea begutachtet.





Abb. 3.21: Repräsentativer Vergleich eines zentralen Korneabereiches zwischen NaCl- und MSC-Gruppe (5 Tage) in 200-facher Vergrößerung am konfokalen Mikroskop. Skala 100µm.

In keinem der untersuchten Bereiche in keiner Kornea fanden sich GFP- oder Nestin-positive Zellen.

4. Diskussion

Bis zum heutigen Tag existiert bis auf die Transplantation der Speicheldrüse keine kurativ ausgerichtete Therapie des ADDE (siehe 1.3.6). Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten, wie etwa Tränensubstitutionsmittel, bewirken zumeist nur eine Symptomlinderung. Aufgrund der hohen Prävalenz der Erkrankung sowie dem hohen Leidensdruck der betroffenen Patienten ist es daher von hohem klinischem Interesse, eine kurativ ausgerichtete Therapie für die Behandlung der Erkrankung des ADDE aufzudecken.

Die Entwicklung einer solchen kurativen Therapie ist gegenwärtig das Ziel vieler Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Augenforschung, wobei es hier ganz unterschiedliche Ansätze gibt. Bei den meisten vielversprechenden Therapieansätzen besteht jedoch der Bedarf weiterer Studien, um die Sicherheit einer Anwendung am Patienten und die Praktikabilität im klinischen Alltag zu garantieren.

Mesenchymale Stammzellen stellen einen vielversprechenden potenziellen kurativen Therapieansatz dar. In zahlreichen Studien anderer Forschungsgruppen wurden die positiven Eigenschaften von MSC bereits herausgestellt. Hierzu gehören unter anderem die Förderung der Regeneration, antiinflammatorische Effekte sowie die Verfügbarkeit in vielen unterschiedlichen Gewebearten. Durch diese und weitere Eigenschaften haben die MSC einen Vorteil gegenüber anderen aktuell diskutierten Ansätzen zur Regeneration der Tränendrüse.

Durch die Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gelang es erstmalig, MSCs in der Tränendrüse nachzuweisen [61]. Im Folgenden wurde dann ein Mausmodell etabliert, um die möglichen Effekte dieser MSCs zu untersuchen [58, 62]. Dies ist insofern auch von großer Bedeutung, da ein gutes Modell eine unerlässliche Basis für aussagekräftige und reproduzierbare Versuchsreihen darstellt.

Im Fokus der Versuche von Dietrich et al. stand die Tränendrüse. Hier konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, die belegen, dass die MSC als potenziell kurative Therapie tatsächlich einen positiven Effekt auf eine geschädigte Tränendrüse haben. Es zeigte sich, dass MSC die Regeneration einer zuvor geschädigten Tränendrüse fördern und somit einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf im Patienten haben könnten.

Die Augenoberfläche bei ADDE stand bisher jedoch nicht im Mittelpunkt der Studien unserer Arbeitsgruppe. Da jedoch Veränderungen der Augenoberfläche bei ADDE allgemeinhin bekannt sind, sind also auch hier weitere Erkenntnisse von großem Interesse. In dieser Studie wurden daher frisch gewonnene murine Tränendrüsen-MSC in eine mit der Ductus Ligatur geschädigte Tränendrüse transplantiert und anschließend ein möglicher Effekt dieser MSCs auf die Augenoberfläche analysiert.

4.1.1. Veränderung der Morphologie auf der Augenoberfläche

Das Ziel der HE-Färbung war es, anhand der kornealen Epithelzelldicke oder der Anzahl der kornealen Epithelzellschichten einen Rückschluss über die Schädigung der Augenoberfläche und einen potenziellen regenerativen Effekt der MSC zu ziehen.

Bei der Untersuchung der Schädigung an der Augenoberfläche ließ sich unter anderem (siehe 2.1.2) ein Abfall der kornealen Epithelzelldicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe feststellen. Dies war besonders stark in den beiden 5-Tages-Gruppen zu verzeichnen. Wenn man also annimmt, dass eine reduzierte Epithelzelldicke mit einer Schädigung korreliert, dann ließe dies die Aussage zu, dass die Schädigung auf der Augenoberfläche zu diesem Augenblick am größten ist. Es kommt zudem zu einem Abfall der Zellschichten von Tag 0 zu Tag 5 in nahezu allen NaCl-Gruppen (Ausnahme: Messpunkt 4). Bei der Ausmessung der Epithelzelldicke konnte ein Anstieg der Zelldicke und Zellschichten von Tag 5 zu Tag 21 in den MSC-Gruppen dokumentiert werden.

Hier ist anzumerken, dass die Dickenmessung ein Verfahren ist, welches Computer-assistiert durchgeführt wurde und daher auch über eine höhere Genauigkeit und Aussagekraft verfügt. Die Epithelzellschichten wurden hingegen manuell ausgezählt, was ein höheres Potential für eventuelle Interpretationsfehler beinhaltet.

Bei der Auszählung der konjunktivalen Becherzellen (siehe 2.2.) konnte man eine Abnahme der Becherzellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen MSC-Gruppen sowie der NaCl-Gruppe an Tag 5 sehen. Zudem war die Zahl der Becherzellen in der NaCl-Gruppe an Tag 5 niedriger als an Tag 0, was die Ergebnisse aus den beiden zuvor genannten Methoden widerspiegelt. In der NaCl-Gruppe gab es auch einen signifikanten Anstieg von Tag 5 zum Tag 21, jedoch nicht in der MSC-Gruppe.

Man weiß, dass es beim trockenem Auge nicht nur zu einem Abfall der Becherzellen, sondern auch zu einer Veränderung bzw. Reduktion der membrangebundenen sowie sekretorischer Muzine kommen kann [18]. Diese Veränderungen sind noch nicht abschließend erforscht, verdeutlichen jedoch, dass es vermutlich nicht ausschließlich zu einer quantitativen Reduktion der Zellen kommt, sondern auch zu einer qualitativen Zusammensetzung der Muzine. Hier wäre es also auch interessant, die Zusammensetzung der Muzine bei den untersuchten Tieren zu beurteilen.

Es ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht komplett bewiesen, wo sich Stammzellen zur Regeneration auf der Konjunktiva befinden [18]. Es besteht also gegenwärtig noch kein ausreichendes Verständnis dafür, wie genau und wie schnell sich die Konjunktiva regeneriert und somit auch nicht, wann und in welchem Ausmaß man mit einem Anstieg der Becherzellzahl nach einer Schädigung rechnen sollte.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der HE-Färbung und der PAS-Reaktion, so kann man schlussfolgern, dass es aufgrund der Ductus Ligatur zu einem Schaden auf der Kornea und der Konjunktiva kommt, dieser ist insbesondere an Tag 5 zu beobachten. Dieser Schaden wurde insbesondere in der Gruppe, wo eine Injektion mit MSCs verwendet wurde, entweder abgemildert (im Sinne einer höheren Dicke, größerer Schichtenanzahl etc.) oder gewissermaßen reversibel gemacht werden. Allgemein weisen diese beschriebenen Ergebnisse Parallelen auf zu den Ergebnissen, welche unsere Arbeitsgruppe bei der Untersuchung der Tränendrüse gewinnen konnte. Hier zeigte sich ebenfalls, dass die Tränendrüse bis zum 5. Tag nach der Ductus Ligatur eine signifikant ausgeprägte Schädigung aufweist, bis dann das endogene Regenerationspotential seine Wirkung entfaltet und es zu einer (partiellen) Regeneration bis Tag 21 kommt [58].

Die Betrachtung von Ki76-positiven, proliferativ aktiven Zellen zeigte, dass diese besonders in der NaCl-Gruppe an Tag 0 vorliegen. Hier ist es interessant, weshalb in der MSC-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt nicht ähnlich viele positive Zellen nachzuweisen sind. Möglicherweise gibt es Unterschiede zum Zeitpunkt des Proliferationsbeginns in dieser Gruppe.

Bei der Betrachtung des Apoptosemarkers Caspase-3 konnte man feststellen, dass es vor allem am 5. und 21. Tag sowohl in der NaCl- als auch in der MSC-Gruppe besonders viele Caspase-3-positive Zellen gab. Diese vermehrte Ansammlung von apoptotischen Zellen bestätigt nochmals den Schaden der Augenoberfläche in diesen Gruppen. Interessanterweise fanden sich in den MSC-Gruppen an Tag 5 und Tag 21 deutlich weniger apoptotische Zellen als in den vergleichbaren NaCl-Gruppen. Dies könnte für einen regenerativen bzw. anti-apoptotischen Effekt der MSC sprechen.

Die Untersuchung der Augenoberfläche *in vivo* mittels Fluoreszein-Färbung lieferte leider kein signifikantes Ergebnis. Diese Methode wird im klinischen Alltag genutzt, um Schäden infolge von trockenen Augen beim Menschen zu detektieren, jedoch leiden die entsprechenden Patienten zum Untersuchungszeitpunkt in der Regel schon eine längere Zeit unter dieser Symptomatik. Bei unserem Versuch sah man keine entsprechende Schädigung des kornealen Epithels. Es ist zu überlegen, ob es nach der zugeführten Schädigung durch die Ductus Ligatur nicht einen längeren Zeitraum bräuchte, um eine entsprechend sichtbare Wirkung auf der Augenoberfläche zu entfalten.

Als weitere Methode zur Untersuchung des kornealen Epithels und der limbalen Stammzellen wurde diese mit den Antikörpern gegen CK-15 und p63 α angefärbt. Hier war es von besonderem Interesse, ob bei einer stärker ausgeprägten Schädigung, analog zu der Fluoreszein-Methode, es zu Änderungen im Anfärbeverhalten der einzelnen Gewebearten kommt, z.B. dass man Schaden in Form von Unregelmäßigkeiten im CK15-positiven Epithel sieht. Nach der Betrachtung aller Augen kann man sagen, dass man solche Auffälligkeiten nicht feststellen konnte.

Daher ist auch hier zu überlegen, ob bei einem längeren Beobachtungszeitraum ein signifikanteres Ergebnis beobachtet werden könnte. Der für unsere Versuchsreihe ausgewählte Zeitraum von 21 Tagen beruhte auf der Annahme, dass innerhalb dieser Zeit ein (endogener) Regenerationsprozess der Tränendrüse beobachtet werden kann, was sich in der späteren Analyse des Tränendrüsengewebes auch als richtig erwies.

4.1.2. Ausmaß der Entzündungsreaktion

Bei der Betrachtung der vier untersuchten Entzündungsmarker fällt auf, dass es auf der Konjunktiva eine stärkere Entzündungsreaktion zu geben scheint als auf der Kornea. Wenn es auf der Kornea zu einer Reaktion kommt, dann überwiegend im Stroma und weniger auf dem kornealen Epithel. Diese Erkenntnis deckt sich mit dem aktuellen Wissenstand über die Verteilung und Aktivierung der Immunzellen in der Kornea [63].

Studien zu Immunzellen, die in der Konjunktiva vorkommen, legen nahe, dass diese bereits in einer gesunden Konjunktiva vorkommen. Dabei scheinen CD3-positive T-Zellen mit Abstand die größte Population zu sein, gefolgt von Makrophagen. Es kommen auch B-Zellen, neutrophile Granulozyten und andere Zelltypen vor, jedoch in einer deutlich geringeren Menge [4, 5].

In den untersuchten Mausaugen gab es signifikant mehr T-Zellen in der NaCl-Gruppe an Tag 5 und in der MSC-Gruppe an Tag 21. Eine ähnliche Tendenz sieht man bei den Makrophagen, obwohl dieses Ergebnis nicht signifikant ist. Bei dem B220-Marker (B-Zellen) konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden, es gibt auch kein besonderes Verteilungsmuster. Die erhöhte Anzahl der T-Zellen und Makrophagen legen nahe, dass es insbesondere an diesen späteren Zeitpunkten zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion kommt, an Tag 0 ist diese nicht zu beobachten.

Es sind zudem viele Granulozyten in der NaCl-Gruppe an Tag 5 zu verzeichnen. Auffällig ist zudem, dass in allen MSC-Gruppen weniger Ly6G-positive Zellen auffindbar sind als in den NaCl-Gruppen. Da neutrophile Granulozyten als Zellen eines frühen Inflammationsstadiums gelten, kann dies darauf deuten, dass die MSCs eine anti-inflammatorische Wirkung auf der Augenoberfläche bewirken.

Bei der Untersuchung der Tränendrüse innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte ein Anstieg der Ly6G-positiven Zellen insbesondere an Tag 0 und 5 festgestellt werden, daraufhin kam es zu einem Abfall zum Tag 21[58]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es in der Tränendrüse offensichtlich zu einer früher einsetzenden Entzündungsreaktion kommt als auf der Augenoberfläche. Wenn man die Schädigung der Augenoberfläche als eine Folge der Schädigung der Tränendrüse betrachtet, so erscheint diese Erkenntnis nachvollziehbar.

4.1.3. Wanderungsverhalten der MSCs (Whole Mount Methode)

Um zu untersuchen, ob die in die Tränendrüse transplantierten MSCs auf die Augenoberfläche migrierten, führten wir immunologische Färbungen der gesamten Mauskornea (*Whole Mount*) durch. Es fanden sich keinerlei positive Nestin-positive Zellen auf der Augenoberfläche der Tiere. Dieses Ergebnis kann auf mehrere Weisen interpretiert werden. Naheliegend wäre, dass es unter den von uns durchgeführten Bedingungen nicht zu einem Wanderungsverhalten kommt und daher keine Zellen aufzufinden sind. Möglicherweise kommt es zwar zu einem Wanderungsverhalten, jedoch nicht in dem von uns untersuchten Zeitraum. Da das Migrationsverhalten von MSCs durch komplexe Vorgänge wie multiple Botenstoffe beeinflusst wird [64] ist ein Zeitpunkt für unsere Rahmenbedingungen nur schwer zu eruieren.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ließen sich folgende Erkenntnisse gewinnen:

- Abnahme der Zellschichten von Tag 0 zu Tag 5 in nahezu allen NaCl-Gruppen (Ausnahme: Messpunkt 4)
- Anstieg der Zelldicke und Zellschichten von Tag 5 zu Tag 21 in den MSC-Gruppen
- Abnahme der Becherzellen in der NaCl- und MSC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ausnahme: NaCl Tag 0 und 21)
- Abnahme der Becherzellen von Tag 0 zu Tag 5 in der NaCl-Gruppe
- Zunahme der Apoptose an Tag 5 und 21 in der NaCl-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Weniger apoptotische Zellen an Tag 21 in der MSC-Gruppe vs. NaCl-Gruppe
- Anstieg der Ly6G-positiven Zellen in der NaCl-Gruppe an Tag 5 im Vergleich zu der Kontrollgruppe
- Weniger Ly6G-positive Zellen an Tag 5 in der MSC-Gruppe vs. NaCl-Gruppe
- Kein signifikantes Ergebnis bei der Fluoreszein-Färbung
- Kein signifikantes Ergebnis bei CK-15 und p63 α
- Kein signifikantes Ergebnis in der GFP/Nestin-Methode

4.1.5. Besteht ein Hinweis auf eine erfolgreiche Therapie mit MSCs?

Deskriptiv betrachtet lassen sich Unterschiede zwischen der NaCl- und der MSC-Gruppe erkennen, woraus man schließen kann, dass die MSC-Therapie zumindest einen gewissen Effekt auf den Verlauf der Schädigung auf die Augenoberfläche hat.

Die vermeintliche vermehrt beobachtete "Verbesserung" des Zustandes von Tag 5 auf Tag 21, welche man als Regeneration interpretieren kann, ist ein Beispiel dafür (siehe einen Anstieg in der Epithelzellschichtzahl oder der Dicke, weniger apoptotische Caspase-3-positive und weniger Ly6Gpositive Zellen). Somit kann der Eindruck entstehen, dass es sich hierbei um eine regenerative Wirkung der MSCs handelt.

Andererseits lässt sich aber auch ein endogen induziertes Regenerationspotential in der NaCl-Gruppe erkennen. So sieht man auch hier, analog zu der MSC-Gruppe, eine "Verbesserung" von Tag 5 zu Tag 21, wie z.B. in der steigenden Epithelzelldicke und der ansteigenden Becherzellzahl. Aufgrund dieses endogenen Regenerationspotentials ist es teilweise schwer zu differenzieren, welches Ausmaß die MSC-Wirkung hat, ganz besonders, wenn die Unterschiede zwischen der NaCl- und der MSC-Gruppe nicht in allen Methoden signifikant ausfallen. Daher muss hier hinterfragt werden, ob die MSC eine tatsächliche Auswirkung auf die Regeneration haben.

4.2. Ist der Versuchsaufbau gelungen im Hinblick auf die Fragestellung/Arbeitshypothese?

4.2.1. Andere gängige Modelle zur Erforschung des trockenen Auges

In der Literatur wurden bereits mehrere Modelle beschrieben, um das trockene Auge zu simulieren und zu untersuchen. Je nach Zielsetzung und Fragestellung bieten sich bei Tiermodellen *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Methoden an (s.u.), auch bei der Wahl der Spezies gibt es eine gewisse Variabilität. Eine wesentliche Herausforderung besteht darin, dass das trockene Auge, eine multifaktorielle Erkrankung ist. Nicht nur die zeitliche Komponente der chronischen Erkrankung spielen eine Rolle, sondern auch das Alter der Spezies (trockenes Auge als Erkrankung des eher höheren Lebensalters), das Geschlecht und die damit verbundenen neuroendokrinen Einflüsse sowie diverse Faktoren der Umwelt (Luftverhältnisse etc.).

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte bereits herausgestellt werden, dass Kaninchen beispielsweise gut geeignet zur Untersuchung der Augenoberfläche sind. Sie haben eine längere Lebensspanne, als beispielsweise Mäuse und verfügen über eine große Augenoberfläche, welche sowohl die Versuchshandhabung verbessern als auch eine bessere Untersuchung ermöglicht.

Mäuse hingegen sind mittlerweile sehr gut erforscht, beispielsweise auf die Antikörper-Kompatibilität und genetisch veränderte Varianten. Sie eignen sich auch sehr gut, um Autoimmunprozesse zu evaluieren [65]. Ersteres ist insofern wichtig, da die geschilderten Versuche größtenteils auf (immun)-histologischen Methoden beruhen.

Zur Simulation des trockenen Auges im Tiermodell werden in der Literatur mehrere Methoden beschrieben. Besonders erwähnenswert sind hier invasiv-operative Vorgehen, die externe Bestrahlung des Auges und ein pharmakologischer Einfluss, z.B. mittels Augentropfen.

Die vermutlich verbreitetste Variante ist eine mechanisch-operative Unterbrechung des Tränenflusses. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits versucht, die Haupttränendrüse von Hunden, Katzen oder Mäusen zu entfernen, was zu einer nachweislichen Reduktion des Tränenvolumens im Schirmer-Test geführt hat [66]. Was jedoch diesen Versuchen gemeinsam und auffällig ist, ist die Tatsache, dass diese Intervention nur wenig Effekt auf die Krankheitsausprägung auf der Augenoberfläche hat. Es wird hierzu vermutet, dass akzessorische Tränendrüsen hierbei eine wichtige kompensatorische Rolle spielen. Auch in Affenmodellen, die sich anatomisch vom Aufbau des okulären Apparates sehr uns Menschen ähneln, konnte man ähnliches feststellen [67]. Nach einer Entfernung der Haupttränendrüse kam es zwar zu einer Abnahme der Tränensekretion, jedoch blieb eine signifikante Reaktion auf der Augenoberfläche aus. Wie bereits zuvor geschildert, blieben auch in unserem Modell z.B. in der Fluoreszein-Methode signifikante Ergebnisse aus.

Man könne nun hieraus voreilig schlussfolgern, dass das ausgesuchte Verfahren für die Fragestellung dieser Studie vielleicht nicht das geeignete sei. Hier muss man jedoch bedenken, dass das Hauptziel der gesamten Studie die Untersuchungen des regenerativen Potentials von mesenchymalen Stammzellen auf eine geschädigte Tränendrüse und gleichzeitig auf die Augenoberfläche ist und nicht die reine Untersuchung eines möglichen regenerativen Potentials der mesenchymalen Stammzellen auf einer massiv geschädigten Augenoberfläche. Zudem zeigen andere Modelle des trockenen Audes ebenfalls Nachteile.

Es existiert zum Beispiel die Möglichkeit, mittels externer Bestrahlung die Funktion der Tränendrüse herabzusetzten. Die Arbeitsgruppe um Hakim et al. hat dies an Kaninchen durchgeführt und hat eine resultierende Veränderung der Tränendrüsenstruktur mit einer reduzierten Tränenmenge beobachten können [68]. Rocha et al. konnten ähnliche Resultate bei einem Mausmodell erzielen [69]. Letztere Arbeitsgruppe hat zudem eine signifikante Reduktion der kornealen Epithelzelldicke festgestellt. Unvorteilhaft ist bei diesem Modell die potenziell schädliche Auswirkung von Strahlen sowie mögliche Kollateralschäden im umliegenden Gewebe.

Neben der mechanisch-operativen sowie radio-induzierten Variante existiert zudem die Möglichkeit, die Sekretion der Tränendrüse mittels einer pharmakologischen Blockade zu induzieren. Aufgrund der starken sympathischen Innervation werden hier gehäuft Parasympathomimetika wie Atropin angewendet [70]. Bei dieser Methode können ausgeprägte Schäden sowohl im Schirmer-Test als auch bei der Fluoreszein-Färbung beobachtet werden, sie erzeugen also eine klinisch deutlich nachweisbare Reaktion auf der Augenoberfläche. Es handelt sich jedoch nicht um eine Pathogenese, die der natürlichen Entstehung des trockenen Auges vergleichbar ist.

Eine zunehmende Bedeutung gewinnt aktuell die Forschung an genetisch veränderten Mäusen, z.B. NOD (*non-obese diabetic*) Mäusen. Diese weisen Merkmale auf, die bei der Erforschung des DED von Nutzen sein könnten. Darunter fallen die Entwicklung von Autoimmunprozessen mit lymphozytärer Infiltration von u.a. Tränendrüsengewebe mit konsekutiver Funktionseinschränkung [71, 72]. Die Gruppe um Hiraishi et al. [73] hat mit BXSB/MpJ-Yaa Mäusen gearbeitet, welche ebenfalls autoimmune Prozesse entwickeln. Hier konnte man nach einer zeitlichen Latenz eine Auswirkung der Erkrankung auf die Augenoberfläche feststellen, darunter die Reduktion der Becherzellen sowie eine Umstrukturierung des kornealen Epithels.

Es gibt aktuell keine guten Möglichkeiten, die Umwelteinflüsse zu simulieren. Eine Arbeitsgruppe hat beispielsweise Kaninchen ein Lidspeculum eingesetzt, um sie vom Blinzeln abzuhalten, was zu signifikanten Schäden der Augenoberfläche geführt hat. Solche Beispiele sind aber nicht gut geeignet, da sie nicht die zeitlich-chronischen Aspekte dieser Grunderkrankung berücksichtigen sondern eher ein akutes Trauma betrachten [74].

Die Arbeitsgruppe von Dursun et al. hat ein Modell aufgestellt, welches sowohl neuroinhibitorische als auch Umweltaspekte vereint: transdermaler Einsatz von Scopolamin und Verwendung von Lufttrocknern an Mäusen [75]. Nur in der Gruppe mit Scopolamin konnten relevante Unterschiede verzeichnet werden.

56

Bezüglich des Einsatzes von MSC hat die Arbeitsgruppe um Beyazyıldız einen Versuchaufbau durchgeführt, der Parallelen zu unserem Aufbau aufweist [76]. Sie haben Rattenaugen topisch mit Benzalkoniumchlorid behandelt, um ein trockenes Auge zu induzieren. Einer Gruppe habe man dann topisch MSCs verabreicht, der anderen PBS. Man sah einen signifikanten Anstieg funktioneller Strukturen sowie konjunktivaler Becherzellen in der MSC-Gruppe. Besonders erwähnenswert war auch die anti-inflammatorische Wirkung von MSCs. Die Gruppe um Kwon et al. hat ein trockenes Auge mittels trockener Luft in Ratten induziert, um danach einem Teil von ihnen topisch MSCs zu verabreichen. Bei Kontrollgruppe sah man anschließend einen signifikant größeren Schaden der Augenoberfläche mit Desquamation und Reduktion der muzinbildenden Becherzellen als in der MSC-Gruppe [77].

4.2.2. Vergleich mit den Ergebnissen von Dr. Dietrich (Evaluation der Ductus Ligatur und des Regenerationspotentials der MSCs auf die Tränendrüse)

Insgesamt lassen sich die bisherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe folgendermaßen zusammenfassen:

Nach der Ausführung der bereits beschriebenen Operationsschritte konnte im Rahmen einer Schädigung ein struktureller Umbau der Tränendrüse festgestellt werden, welche durch den Verlust funktioneller Azini, Gewichtsreduktion der Tränendrüse und Reduktion des Tränenvolumens gekennzeichnet war. Darüber hinaus sah man eine schwere Entzündungsreaktion der Tränendrüse [58].

Zudem ließ sich ein Anstieg der MSCs in der Schädigungs- und der Regenerationsphase feststellen. Eine Transplantation von MSCs führte zudem zu einer Erhöhung der vitalen Azini und zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion.

Darüber hinaus gelang es, eine reine MSC-Population aus der Tränendrüse zu isolieren. Es konnten anhand des Sekretoms Proteine wie Lipocalin-2, Prosaposin, Rac1 und STAT1 nachgewiesen werden, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Regenerationsprozesse *in vitro* aufzeigten.

Für die Untersuchung des Tränenvolumens und des Einflusses auf die Tränendrüse scheint das vorhandene Versuchsmodell sehr gut geeignet zu sein. Unter der Berücksichtigung der oben genannten Aspekte sieht man jedoch einen gewisses Verbesserungspotential, wenn es um die Betrachtung der Schädigung auf der Augenoberfläche geht.

4.3.3. Mögliche Lösungsvorschläge für ein signifikanteres Ergebnis

In Anbetracht der nicht aussagekräftigen Ergebnisse in der Fluoreszein-, der CK15- und p63 α -Methode stellt sich die Frage auf, ob nicht bei einer Betrachtung über einen längeren Zeitraum, in etwa mehreren Wochen, ein signifikantes Ergebnis zu erzielen wäre.

Bei den verwendeten Tieren handelt es sich zudem mit ca. 9-10 Wochen um junge Tiere, wobei die Krankheit hauptsächlich bei älteren Menschen auftritt. Sollte man eine Fortsetzung der Versuche auf diesem Gebiet anstreben, so ist eine Verwendung älterer Tiere zu überdenken oder einer Tierart, welche aufgrund ihrer längeren Zeitspanne, besser das menschliche Auge widerspiegelt.

Innerhalb der gesamten Versuchsreihe sind regelmäßig vereinzelt Ausreißer aufgefallen, die insbesondere bei einer n-Zahl von 6 zu unterschiedlichen Ausgangssituationen geführt haben. So ist beispielsweise zu erwarten, dass die Ergebnisse an Tag 0 sowohl in der NaCl- als auch in der MSC-Gruppe stets vergleichbar sein sollten, denn der Zeitraum (5 Minuten nach Injektion) ist realistisch gesehen nicht ausreichend, um einen Unterschied zwischen den Gruppen zu bewirken. Ein größeres Testkollektiv würde hier zu einem aussagekräftigeren Ergebnis beitragen.

Um sich die induzierte therapeutische Wirkung besser betrachten zu können, wäre es sinnvoll, das eigene Regenerationspotential des Gewebes zu unterdrücken. Dies ist z.B. aktuell mit genetisch modifizierten Mäusen möglich, z.B. NOD-Mäusen [58]. Hierbei kann z.B. der Einfluss von endogenem und exogenem Regenerationspotential besser differenziert werden.

Des Weiteren wurde auch der Einfluss von akzessorischen Tränendrüsen auf die Stabilisierung des Tränenfilms diskutiert. Hierzu fehlen noch entscheidende Erkenntnisse, um das Ausmaß dieses Einflusses tatsächlich zu beurteilen. Insgesamt existiert zum aktuellen Zeitpunkt ein weitreichendes, dennoch nicht abschließendes Verständnis zur Pathogenese des DED. Weitere Forschungsergebnisse auf dieser Ebene sollten in zukünftigen Krankheitsmodellen berücksichtigt werden.

4.3. Evaluation der Ergebnisse im Hinblick auf die Arbeitshypothese

4.3.1. Berücksichtigung eigener Ergebnisse

Unter der Berücksichtigung der am Anfang gesetzten Ziele, lassen sich nun folgende Schlussfolgerungen ziehen.

Das verwendete Mausmodell ist insofern sinnvoll, dass tatsächlich eine Reaktion im Gewebe ausgelöst wird, jedoch primär auf histologischer Ebene. Klinisch lässt sich kaum ein Unterschied auf der Augenoberfläche feststellen.

Das Mausmodell, so wie es aktuell verwendet wurde, scheint zwar gut für die Evaluation der Tränendrüse zu sein, jedoch nicht für die Augenoberfläche. Hier besteht bei zukünftigen Studien ein Verbesserungspotential v.a. im Hinblick auf die Zeitspanne zwischen der Schädigung und der Evaluation. Andere Faktoren, wie das Alter der Spezies, ihr eignes endogenes Regenerationspotential sowie äußere Einflüsse sollten idealerweise auch berücksichtigt werden.

MSCs scheinen einen positiven Effekt auf die Regeneration, insbesondere auf die Tränendrüse zu haben. Dieser Effekt ist jedoch in der vorliegenden Studie im Hinblick auf die Augenoberfläche nicht so stark ausgeprägt wie erwartet. Des Weiteren ist es aufgrund des recht hohen endogenen Regenerationspotentials nicht ganz eindeutig, welche Effekte auf eine endogene und welche auf eine exogen zugeführte Regeneration zurückzuführen ist. Wie schon von der Arbeitsgruppe angedeutet, könnten MSCs auch im klinischen Alltag durchaus eine mögliche therapeutische Lösung darstellen. Hier sind jedoch in der Zukunft einige wichtige Schritte zu tun. Ein deutlicher Nachteil gegenüber den bereits existierenden Therapien stellt die umständliche Beschaffung und die damit verbundenen Kosten der MSCs dar. Wie bereits von Dr. Dietrich vorgeschlagen, sollte das Regenerationspotential der MSCs weiter untersucht werden. Es ist beispielsweise denkbar, dass allein die Injektion bestimmter Proteine ausreichend sein könnte, um einen Heilungsprozess zu induzieren.

4.4. Abschließendes Fazit

In Bezug auf die initial gestellte Arbeitshypothese lässt sich sagen, dass aufgrund der histologischen Ergebnisse die MSCs einen gewissen therapeutischen Effekt auf die zuvor geschädigte Augenoberfläche zu haben scheinen. Die Vorzüge der MSCs in Bezug auf die Geweberegeneration werden jedoch durch Studien, sowohl von der Arbeitsgruppe, v.a. an der Tränendrüse und natürlich auch in den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen eindeutig angezeigt. Daher lässt sich in diese Richtung ein vielversprechendes Potential erkennen, welches in weiteren, folgenden Studien untersucht werden sollte.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. Lang, G.K., *Augenheilkunde*. 6., überarbeitete Auflage ed. 2019: Georg Thieme Verlag.
- 2. Grehn, F., *Augenheilkunde*. 2019: Springer Verlag.
- 3. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 5. Auflage ed. 2018, München: Urban & Fischer in Elsevier (Verlag).
- Hingorani, M., D. Metz, and S.L. Lightman, *Characterisation of the Normal Conjunctival Leukocyte Population*. Experimental Eye Research, 1997. 64(6): p. 905-912.
- 5. Allansmith, M.R., J.V. Greiner, and R.S. Baird, *Number of Inflammatory Cells in the Normal Conjunctiva*. American Journal of Ophthalmology, 1978. **86**(2): p. 250-259.
- 6. Bron, A.J., et al., *Functional aspects of the tear film lipid layer*. Experimental Eye Research, 2004. **78**(3): p. 347-360.
- Willcox, M.D.P., et al., *TFOS DEWS II Tear Film Report*. The Ocular Surface, 2017. 15(3): p. 366-403.
- 8. Craig, J.P., et al., *TFOS DEWS II Definition and Classification Report*. The Ocular Surface. **15**(3): p. 276-283.
- 9. Bron, A.J., et al., *TFOS DEWS II pathophysiology report.* The Ocular Surface, 2017. **15**(3): p. 438-510.
- 10. Stapleton, F., et al., *TFOS DEWS II Epidemiology Report*. The Ocular Surface. **15**(3): p. 334-365.
- 11. Reitmeir, P., et al., *Common eye diseases in older adults of southern Germany: results from the KORA-Age study.* Age and Ageing, 2017. **46**(3): p. 481-486.
- 12. Paulsen, A.J., et al., *Dry Eye in the Beaver Dam Offspring Study: Prevalence, Risk Factors, and Health-Related Quality of Life.* American Journal of Ophthalmology, 2014. **157**(4): p. 799-806.
- 13. Sullivan, D.A., et al., *TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report.* The Ocular Surface, 2017. **15**(3): p. 284-333.
- 14. Jacobi, C., et al., *Tear Film Osmolarity Measurements in Dry Eye Disease Using Electrical Impedance Technology*. Cornea, 2011. **30**(12).
- 15. Lemp, M.A., et al., *Tear Osmolarity in the Diagnosis and Management of Dry Eye Disease*. American Journal of Ophthalmology, 2011. **151**(5): p. 792-798.e1.
- 16. Huet, E., et al., *EMMPRIN modulates epithelial barrier function through a MMPmediated occludin cleavage: implications in dry eye disease.* The American journal of pathology, 2011. **179**(3): p. 1278-1286.
- 17. Yeh, S., et al., *Apoptosis of Ocular Surface Cells in Experimentally Induced Dry Eye.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2003. **44**(1): p. 124-129.
- Bron, A.J., et al., *TFOS DEWS II pathophysiology report.* The Ocular Surface. **15**(3): p. 438-510.
- 19. Pisella, P.-J., et al., *Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca.* Ophthalmology, 2000. **107**(10): p. 1841-1849.
- 20. Ralph, R.A., *Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1975. **14**(4): p. 299-302.
- 21. Zhao, H., et al., *Quantification of MUC5AC Protein in Human Tears*. Cornea, 2001. **20**(8).
- 22. Wolffsohn, J.S., et al., *TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report*. The Ocular Surface. **15**(3): p. 539-574.
- 23. Mainstone, J.C., A.S. Bruce, and T.R. Golding, *Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye.* Current Eye Research, 1996. **15**(6): p. 653-661.

- 24. Jones, L., et al., *TFOS DEWS II Management and Therapy Report*. The Ocular Surface, 2017. **15**(3): p. 575-628.
- 25. *Leitlinie Nr.11 "Trockenes Auge (Sicca-Syndrom) und Blepharitis"*, D.O.G.e.V. Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V., Editor. 2019.
- 26. Dogru, M., et al., *Changing trends in the treatment of dry-eye disease*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2013. **22**(12): p. 1581-1601.
- 27. Jones, L., et al., *TFOS DEWS II Management and Therapy Report*. The Ocular Surface. **15**(3): p. 575-628.
- 28. Geerling, G., et al., *Quality of salivary tears following autologous submandibular gland transplantation for severe dry eye.* Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2000. **238**(1): p. 45-52.
- 29. Geerling, G., et al., *Toxicity of Natural Tear Substitutes in a Fully Defined Culture Model of Human Corneal Epithelial Cells.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**(5): p. 948-956.
- 30. Yoon, K.-C., et al., *Application of Umbilical Cord Serum Eyedrops for the Treatment of Dry Eye Syndrome*. Cornea, 2006. **25**(3).
- 31. Benitez-Del-Castillo, J.M., et al., *Safety and Efficacy Clinical Trials for SYL1001, a Novel Short Interfering RNA for the Treatment of Dry Eye Disease.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2016. **57**(14): p. 6447-6454.
- Lim, L. and E.W.L. Lim, *Therapeutic Contact Lenses in the Treatment of Corneal and Ocular Surface Diseases—A Review.* The Asia-Pacific Journal of Ophthalmology, 2020.
 9(6): p. 524-532.
- 33. Novack, G.D., et al., *TFOS DEWS II Clinical Trial Design Report*. The Ocular Surface, 2017. **15**(3): p. 629-649.
- 34. Colligris, B., H.A. Alkozi, and J. Pintor, *Recent developments on dry eye disease treatment compounds*. Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society, 2014. **28**(1): p. 19-30.
- 35. Lambiase, A., et al., A Two-Week, Randomized, Double-masked Study to Evaluate Safety and Efficacy of Lubricin (150 μg/mL) Eye Drops Versus Sodium Hyaluronate (HA) 0.18% Eye Drops (Vismed[®]) in Patients with Moderate Dry Eye Disease. The Ocular Surface, 2017. **15**(1): p. 77-87.
- 36. Sacchetti, M., et al., *Effect of recombinant human nerve growth factor eye drops in patients with dry eye: a phase IIa, open label, multiple-dose study.* The British journal of ophthalmology, 2020. **104**(1): p. 127-135.
- 37. Dogru, M., et al., *Lactoferrin in Sjögren's Syndrome*. Ophthalmology, 2007. **114**(12): p. 2366-2367.e4.
- 38. Mead, O.G., S. Tighe, and S.C.G. Tseng, *Amniotic membrane transplantation for managing dry eye and neurotrophic keratitis.* Taiwan journal of ophthalmology, 2020.
 10(1): p. 13-21.
- 39. Murube, J. and G. Geerling, *Mechanical pump dacryoreservoirs*. Dev Ophthalmol, 2008. **41**: p. 269-282.
- 40. Singh, S., S. Basu, and G. Geerling, *Salivary gland transplantation for dry eye disease: Indications, techniques, and outcomes.* The Ocular Surface, 2022. **26**: p. 53-62.
- 41. Friedenstein, A.J., I.I. Piatetzky-Shapiro, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.* Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1966. **16**(3): p. 381.
- 42. You, S., et al., *Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland.* Investigative ophthalmology & visual science, 2011. **52**(5): p. 2087-2094.

- 43. Meirelles, L.d.S., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(11): p. 2204.
- 44. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.* Science, 1999. **284**(5411): p. 143.
- 45. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.* Experimental Hematology, 2002. **30**(1): p. 42-48.
- 46. Corcione, A., et al., *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions*. Blood, 2006. **107**(1): p. 367-372.
- 47. Svensson, M. and P.M. Kaye, *Stromal-cell regulation of dendritic-cell differentiation and function.* Trends in Immunology, 2006. **27**(12): p. 580-587.
- 48. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 726-736.
- 49. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
- 50. Squillaro, T., G. Peluso, and U. Galderisi, *Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update.* Cell Transplantation, 2016. **25**(5): p. 829-848.
- 51. Jeong, J., et al., *Human salivary gland stem cells ameliorate hyposalivation of radiation-damaged rat salivary glands*. Experimental & Amp; Molecular Medicine, 2013. 45: p. e58.
- 52. Lim, J.-Y., et al., Intraglandular transplantation of bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells for amelioration of post-irradiation salivary gland damage. Oral Oncology, 2013. **49**(2): p. 136-143.
- 53. Møller-Hansen, M., et al., *Safety and feasibility of mesenchymal stem cell therapy in patients with aqueous deficient dry eye disease*. The Ocular Surface, 2021. **19**: p. 43-52.
- 54. Møller-Hansen, M., et al., *Safety and feasibility of mesenchymal stem cell therapy in patients with aqueous deficient dry eye disease*. Ocul Surf, 2021. **19**: p. 43-52.
- 55. Bittencourt, M.K.W., et al., *Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca.* Cell medicine, 2016. **8**(3): p. 63-77.
- 56. Villatoro, A.J., et al., Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. BioMed research international, 2015.
 2015: p. 527926-527926.
- 57. Aluri, H.S., et al., *Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Tear Production in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome.* Stem cells international, 2017. **2017**: p. 3134543-3134543.
- 58. Dietrich, J., et al., *MSc transplantation improves Lacrimal Gland Regeneration after Surgically induced Dry eye Disease in Mice.* Scientific reports, 2019. **9**.
- 59. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
- 60. Bron, A.J., V.E. Evans, and J.A. Smith, *Grading Of Corneal and Conjunctival Staining in the Context of Other Dry Eye Tests.* Cornea, 2003. **22**(7): p. 640-650.
- 61. Roth, M., et al., *The Influence of Oxygen on the Proliferative Capacity and Differentiation Potential of Lacrimal Gland–Derived Mesenchymal Stem Cells.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015. **56**(8): p. 4741-4752.
- 62. Dietrich, J., et al., *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?* Current Eye Research, 2016. **41**(9): p. 1131-1142.
- 63. Wilson, S.E., et al., *The Corneal Wound Healing Response:: Cytokine-mediated Interaction of the Epithelium, Stroma, and Inflammatory Cells.* Progress in Retinal and Eye Research, 2001. **20**(5): p. 625-637.
- 64. Fu, X., et al., *Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair*. Cells, 2019. **8**(8): p. 784.
- Stefan Schrader, A.K.M., Gerd Geerling, Caffery, Barbara A., Animal Models of Dry Eye. Geerling G, Brewitt H (eds): Surgery for the Dry Eye., 2008. vol 41: p. pp 298–312.
- Barabino, S. and M.R. Dana, *Animal Models of Dry Eye: A Critical Assessment of Opportunities and Limitations*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2004.
 45(6): p. 1641-1646.
- 67. Maitchouk, D.Y., et al., *Tear Production After Unilateral Removal of the Main Lacrimal Gland in Squirrel Monkeys.* Archives of Ophthalmology, 2000. **118**(2): p. 246-252.
- Hakim, S.G., et al., Early and late immunohistochemical and ultrastructural changes associated with functional impairment of the lachrymal gland following external beam radiation. International Journal of Experimental Pathology, 2006. 87(1): p. 65-71.
- 69. Recovery of Radiation-Induced Dry Eye and Corneal Damage by Pretreatment with Adenoviral Vector-Mediated Transfer of Erythropoietin to the Salivary Glands in Mice. Human Gene Therapy, 2013. **24**(4): p. 417-423.
- 70. Burgalassi, S., et al., *Development of a Simple Dry Eye Model in the Albino Rabbit and Evaluation of Some Tear Substitutes.* Ophthalmic Research, 1999. **31**(3): p. 229-235.
- 71. Kikutani, H. and S. Makino, *The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains*, in *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, Editor. 1992, Academic Press. p. 285-322.
- 72. Humphreys-Beher, M.G., et al., Utilization of the Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse as an Animal Model for the Study of Secondary Sjögren's Syndrome, in Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance, D.A. Sullivan, Editor. 1994, Springer US: Boston, MA. p. 631-636.
- 73. Hiraishi, M., et al., *Histopathological changes in tear-secreting tissues and cornea in a mouse model of autoimmune disease*. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 2020. **245**(12): p. 999-1008.
- 74. Fujihara, T., et al., *Establishment of a Rabbit Short-Term Dry Eye Model.* Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 1995. **11**(4): p. 503-508.
- 75. Dursun, D., et al., *A Mouse Model of Keratoconjunctivitis Sicca*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2002. **43**(3): p. 632-638.
- Beyazyıldız, E., et al., Efficacy of Topical Mesenchymal Stem Cell Therapy in the Treatment of Experimental Dry Eye Syndrome Model. Stem Cells International, 2014.
 2014: p. 250230.
- 77. Kwon, Y.S., et al., *Effect Of Mesenchymal Stem Cells On A Rat Dry Eye Model*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012. **53**(14): p. 2358-2358.

Anhang

• Originalansicht der Publikation:

Jana Dietrich, Lolita Ott, Mathias Roth, Joana Witt, Gerd Geerling, Sonja Mertsch, Stefan Schrader, 2019, Mesenchymal Stem Cell Transplantation Improves Lacrimal Gland Regeneration after surgically Induced Dry Eye Disease in Mice. www.nature.com/scientificreports doi: 10.1038/s41598-019-54840-5

SCIENTIFIC REPORTS natureresearch

OPEN MSC Transplantation Improves Lacrimal Gland Regeneration after Surgically Induced Dry Eye Disease in Mice

Jana Dietrich ()¹, Lolita Ott², Mathias Roth², Joana Witt ()², Gerd Geerling², Sonja Mertsch ()¹ & Stefan Schrader¹

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease characterized by a disrupted tear film homeostasis and inflammation leading to visual impairments and pain in patients. Aqueous-deficient dry eye (ADDE) causes the most severe progressions and depends mainly on the loss of functional lacrimal gland (LG) tissue. Despite a high prevalence, therapies remain palliative. Therefore, it is of great interest to develop new approaches to curatively treat ADDE. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) have been shown to induce tissue regeneration and cease inflammation. Moreover, an increasing amount of MSC was found in the regenerating LG of mice. Therefore, this study investigated the therapeutic effect of MSC transplantation on damaged LGs using duct ligation induced ADDE in mice. Due to the transplantation of sex-mismatched and eGFP-expressing MSC, MSC could be identified and detected until day 21. MSC transplantation significantly improved LG regeneration, as the amount of vital acinar structures was significantly increased above the intrinsic regeneration capacity of control. Additionally, MSC transplantation modulated the immune reaction as macrophage infiltration was delayed and TNF or expression decreased, accompanied by an increased IL-6 expression. Thus, the application of MSC appears to be a promising therapeutic approach to induce LG regeneration in patients suffering from severe DED/ADDE.

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease affecting the entire lacrimal functional unit (LFU) including the ocular surface, the lacrimal glands (LG), the meibomian glands, the nervous innervation and the lids. Collectively, the LFU produces the complex and multi-layered tear film required for maintaining a physiological ocular surface¹. The major part of the tear film is composed of the aqueous lacrimal fluid, which is secreted by the LG. The functional tissue of the LG -the acini- consists of secretory acinar cells, duct cells and myoepithelial cells⁴. Any impairment or loss of functional LG tissue lead to an imbalance of tear film bomeostasis and can result in the development of aqueous deficient dry eye (ADDE). This DED subtype causes the most severe courses of the disease. During disease progression, the imbalanced tear film results in ocular surface inflammation, which can lead to corneal ulcers, as well as conjunctival and corneal scars, and thus to impaired vision². Despite a high prevalence of DED with 5–50% depending on ethnic group, age and sex³, current treatment options remain palliative. Therefore, it is clinically of great importance to develop new approaches for a causative therapy. *In situ* regeneration of functional LG tissue has emerged to be a promising approach, and current studies are investigating drugs, gene therapy and stem cell therapy to induce/enhance LG regeneration⁴. However, further research is needed to overcome certain limitations.

One promising source for stem cell therapy to induce LG regeneration might be the use of mesenchymal stem/ stromal cells (MSC), as these cells can be isolated from many different adult tissues and have already shown to exert therapeutic effects on the regeneration of glandular tissues, like pancreas, salivary gland (SG) and LG with chronic DED⁵⁻⁷. In addition, MSC have also been identified and isolated from the healthy and diseased rodent LG⁸⁻¹⁶ and it was shown that the number of MSC increase in regenerating LGs after experimentally induced

³Laboratory of Experimental Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Pius-Hospital, Carl-von-Ossietzky University, 26121, Oldenburg, Germany. ²Laboratory of Experimental Ophthalmology, Department of Ophthalmology, University Hospital Duesseldorf, 40225, Duesseldorf, Germany. *email: jana.dietrich@unioldenburg.de

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

ADDE¹¹⁻¹³. In recent years MSC have been extensively studied and it was found that MSC exert therapeutic effects in a variety of pathological conditions^{14,13}. A huge body of evidence shows that the therapeutic effects of MSC rely on the ability to suppress inflammation and initiate endogenous repair mechanisms. Furthermore, it was shown that MSC secrete trophic factors that affect infiltrating immune cells as well as tissue resident stem cells^{18,17}.

In general, tissue inflammation and new tissue formation followed by tissue remodelling are the three stages of endogenous tissue repair initiated after acute damage¹⁸. Investigations on mouse models with experimentally induced ADDE revealed that the dynamic of LG damage and regeneration passes through the same three phases of tissue repair^{11,19}. As the first two phases include the action of infiltrating immune cells and tissue resident stem cells, which are a target of MSC secreted factors, one could argue that the therapeutic effects of MSC are most valuable when applied directly after acute damage and during the first phase of tissue regeneration.

Ligation of the single secretory duct of the extraorbital LG was identified to induce severe ADDE in mice^{11,13}. Duct ligation (DL), caused a profound loss of functional LG tissue, a severe inflammatory reaction and a reduced tear secretion. The LG, like other glandular tissues, retains the ability of self-regeneration after acute damage throughout its life-time, although it can be impaired due to chronic pathological conditions²⁰. For this reason, the re-opening of the duct in the DL mouse model initiated a phase of new tissue formation/regeneration in juvenile mice, shown by the partial regeneration of vital acinar structures after 21 days by our working group¹¹. This regeneration process was accompanied by an increase of intrinsic MSC. In this study, the therapeutic efficacy of MSC transplantation was investigated regarding LG regeneration after

In this study, the therapeutic efficacy of MSC transplantation was investigated regarding LG regeneration after surgically induced ADDE in mice. This will allow to assess whether the transplantation of extrinsic MSC supports the regeneration of the LG and could be useful in a clinically relevant setting. The use of tissue-specific extrinsic MSC is of great clinical relevance as the LG of patients with severe ADDE exhibit an impaired regenerative potential due to chronic pathological conditions such as persistent inflammation as well as age-dependent degeneration. Since MSC can be found in a variety of tissues and tissue-specific differences between the sub-populations have been described^{11–23}, the use of LG-specific MSC for the treatment of ADDE seems to be superior to treatment with ectopic MSC. Consequently, MSC were isolated from murine LG of male mice expressing eGFP and characterized according to the defined minimal criteria²⁴. DL was implemented on female mice for three days and eGFP-MSC were transplanted when releasing the DL. The analysis of vital acinar structures as the functional tissue of the LG at different time points after duct re-opening (day 5 and day 21) revealed that the transplantation of extrinsic MSC led to an enhanced increase in vital tissue area compared to saline injected LGs. This study provides the first evidences of a regenerative effect of extrinsic tissue specific MSC in an ADDE mouse model.

Results

Characterization of eGFP-MSC. To verify the phenotype of MSC isolated from genetically modified eGFP-mice, the cells were characterized according to the defined minimal criteria²⁴. Cells emerging the LG explant (Exp) exhibited a spindle-shaped, fibroblastic morphology (Fig. 1A). The cumulative population doublings (cpd) revealed a closely linear growth behavior up to passage (p) 6 (11.0 \pm 0.53 cpd) as the coefficient of determination (r²) was 0.9707 (Fig. 1B).

eGFP-MSC expressed the commonly analyzed markers, as the population was >95% positive for nestin, CD44, PDGFRo, CD29, CD90, Sca-1 and <5% for CD73, Ter119, CD34 and CD45 (Fig. 1C). Two CD105 populations were detected, with 59.0 ± 2.6% of MSC being CD105-positive.

Differentiation capacity towards osteocytes and adipocytes was determined. After induction of osteogenesis, the expression of osteopontin significantly increased over time compared to control groups (p = 0.0187 at d7 and p < 0.0001 at d14 and d21; Fig. 1D). In addition, Alizarin Red staining exposed the mineralization of calcium-phosphate deposits and confirmed the differentiation (Fig. 1E). Progression of adipogenesis was monitored by FABP4 expression, which significantly increased after induction compared to control groups (p < 0.0001at al linvestigated time points; Fig. 1F). Furthermore, formation of lipid droplets was visualized by Oil Red O staining (Fig. 1G).

Investigation of eGFP-MSC for transplantation. To assess the genetical stability of eGFP-MSC concerning their stemness, we next investigated nestin, a commonly used marker for multipotent stem cells²³, and the genetically expressed eGFP, as a tracking marker. The eGFP-MSC expressed nestin, which was previously shown to be expressed by MSC isolated from wild-type (wt) B6 LG (Fig. 2A, B)²⁶. In addition, nestin and eGFP expression was stable (>99% each) over 28 days (Fig. 2A). These time interval correlates with the last examination time eGFP-MSC in the transplanted LGs (7 days in culture (*in vitro*) and a maximum of 21 days after transplantation (*in vivo*)).

To investigate the influence of different solution, which can be used for transplantation in mouse surgery, on the vitality of MSC, the cells were incubated on ice for 3–5h in either culture medium, saline, saline +2% FCS, or PBS and then treated once with a 27-gauge needle to mimic transplantation. Propidium iodide staining in flow cytometry showed that, regardless of the solution used, about 80% of the MSC remained vital (Fig. 2C).

Clinical assessment of ADDE. To verify the induction of ADDE after DL clinically relevant measurements were performed¹⁹. The major impact of ADDE is the reduced secretion of lacrimal fluid onto the ocular surface, therefore tear secretion was assessed by a Schirmer test using phenol red cotton threads (Fig. 3A). DL resulted in a tear secretion of 1.10 ± 0.62 mm after saline injection and 0.88 ± 0.29 mm after MSC transplantation (d0), which was significantly reduced compared to basal secretion of 5.04 ± 2.36 mm (Fig. 3B). At day 5 tear secretion was still significantly reduced in both groups (p < 0.0001). However, 21 days of regeneration led to a significant increase with 5.55 ± 3.28 mm secreted tears after saline injection and 5.23 ± 2.32 mm after MSC transplantation, which was comparable to basal secretion.

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5



Figure 1. Characterization of eGFP-MSC. (A, B) eGFP MSC emerging from the explant (Exp) exhibited a spindle-shaped, fibroblastic morphology with a closely linear growth behavior, as detected by the assessment of cpd. (C) Immunophenotyping in p2 revealed the expression of typical MSC markers, while common hematopoietic (stem) cell markers were absent. Two distinct populations were detected for CD105. (D,E) The ability to differentiate towards osteocytes was verified by osteopontin expression and Alizarin Red staining. (F,G) Adipogenic differentiation was confirmed by FABP4 expression and Oil Red O staining. The quantity of positive cells [%] after isotype control staining are provided in the supplementary data file as Fig. S1. Data are n=3, mean \pm S0; scale bar: 100 μ m (A,G) scale bar: 500 μ m. (E) *Represents $p \leq 0.05$ and ***represent $p \leq 0.001$ compared to d0 control.





SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5



Figure 3. Clinical Assessment of ADDE. (A) Phenol red cotton threads were applied to the lateral canthus of each eye and the wetted distance was measured. (B) Tear secretion was significant reduced after DL (0d) but recovered to control levels by d21. (C) Fluorescein staining showed no differences at any time after DL (D) LG weight was significantly reduced at d5 after DL and saline or MSC injection. From d5 to d21 LG weight significantly increased in both groups. (E) Measuring points were defined to cover the whole cornea (F) Thickness of corneal epithelium was significantly decreased after DL at almost any time and in any area of the ocular surface after saline and MSC injection compared to control. Data are n=12 (B–D), n=6 (F), mean \pm SD; **represents $p \leq 0.01$ and ****represent $p \leq 0.0001$ compared to control; **represent $p \leq 0.001$ and measure $p \leq 0.0001$ compared to control;

The presence of fluorescein staining of the ocular surface is a well-established clinical method to measure severity of DED^{2,27}, as fluorescein stains the corneal stroma when the epithelium is disrupted. Therefore, the integrity of the corneal epithelium was investigated by fluorescein staining (Fig. 3C). The evaluation showed no differences neither between control and treatment groups, nor between MSC and saline injection.

Integrity of the corneal epithenium was investigated by nuorescein staining (Fig. 3c.). The evaluation showed no differences neither between control and treatment groups, nor between MSC and saline injection. Damage and regeneration of LGs were further investigated by measuring the LG weight after excision (Fig. 3D). 5 days after re-opening of DL the LG weight was significantly reduced to 2.75 ± 0.57 mg in saline injected and to 3.07 ± 0.44 mg in MSC transplanted LGs compared to control (6.68 ± 0.47 mg). Regeneration of LG up to day 21 led to a significant increase in weight in saline and MSC injected LGs, respectively (p < 0.0001). This resulted in a LG weight comparable to control.

To further determine whether DL had an impact on the ocular surface, thickness of the corneal epithelium was assessed (Figs. 3E,F and S2). Thickness of corneal epithelium decreased significantly at almost any time and in any area after saline and MSC injection compared to control. In the limbal area, only on day 0 after saline

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5



Figure 4. Assessment of MSC after Transplantation. (A) The number of transplanted cells was calculated according to the presence of male gDNA in female recipient gDNA, by *Rbwp* expression in qPCR. Five min (d0) after transplantation the number of MSC were significantly increased and then gradually returned to control. (B) Representative pictures of eGFP detection by western blot. Quantification revealed a significant increase 5 min (d0) after MSC transplantation, which decreased to control levels by d21. (C) Representative pictures of eGFP detection by western blot. Quantification revealed LG at d0 and d5 compared to control. (D) Immunohistochemical staining detected nestin cells, which were significantly increased in saline and MSC injected LG at d0, which further increased at d5. At d21 the number of nestin cells was still significantly increased in saline, but not in MSC group. For western blot analysis the samples (n = 42) were run on four blots, which were processed in parallel. Full blots are provided in the supplementary data file. Data are n = 6, mean \pm SD; *represents p \leq 0.05, **represents p \leq 0.01 and ****represent p \leq 0.0001 compared to control.

injection and on day 21 after MSC transplantation, values comparable to control were observed. Additionally, in the limbal region the thickness of the corneal epithelium was significantly lower after MSC transplantation than after saline injection on day 0 and day 5.

Assessment of MSC after transplantation. To track the MSC within the injured LGs, transplantation of MSC from male eGFP-mice into LGs of female recipients (both mouse strains had the BL/6] background) was performed. The number of MSC present in LG was calculated based on male gDNA (MSC) in female gDNA (recipient mice) using qPCR amplification of a male-specific sequence (*Rmby*). Five min after transplantation $8.19 \times 10^4 \pm 4.98 \times 10^4$ MSC were detected, which gradually decreased to $5.51 \times 10^2 \pm 1.33 \times 10^3$ MSC at day 21 (Fig. 4A).

To confirm the presence of MSC, intrinsic eGFP was quantified. The results showed that the amount of eGFP protein was significantly increased (p < 0.0001) 5 min after transplantation, relative to control and saline injection (Fig. 4B). During regeneration the amount of eGFP decreased and was comparable to that of control at day 21 (relative, normalized density eGFP: 2.12 ± 1.76 , control: 1.0 ± 0.51). In immunohistochemical staining, eGFP cells were detected in the stroma adjacent to acinar structures and could be found 5 min, 5 days and 21 days after transplantation (Fig. S3).

To investigate the presence of intrinsic and transplanted MSC during regeneration, nestin expressing cells were studied. Due to DL (d0) the amount of nestin was significantly increased (p = 0.004 for saline and p = 0.006for MSC) relative to control (Fig. 4C). At day 5 after re-opening of DL and injection of saline, the amount of nestin was still, albeit not significantly, increased. Whereas, at day 5 after MSC transplantation the amount of nestin was still significantly increased (p = 0.037) relative to control. By day 21 the amount of nestin was comparable

SCIENTIFIC REPORTS (2019) 9:18299 https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5



Figure 5. Dynamic of LG damage and regeneration. (A) Area of vital acinar structures calculated in HE stained LG sections. At d21 vital acinar structures recovered to significant higher extent after MSC than saline injection. (B) Control LG had tightly arranged acini, which were organized in lobules and surrounded by few connective tissue. (C,E) Due to DL, LG structure was damaged by interstitial edema, infiltrating cells and shrunken acinar cells with higher cosinophilia. (E) Transplanted MSC were detected in the stroma adjacent to acinar structures (dashed line). (D,F) After re-opening of DL and regeneration, LG structure recovered, and acinar structures re-appeared. (G) The number of MIST1-positive cells in immunohistochemical staining significantly decreased after DL (d0), but gradually increased thereafter and was comparable to control by d21. (H) MIST1 gene expression displayed comparable results to MIST1 immunohistochemical staining. (I) The number of Ki67positive cells in immunohistochemical staining. (I) The number of Ki67positive cells in immunohistochemical staining. (I) The number of Ki67positive cells in immunohistochemical staining. (I) The number of Ki67positive cells in immunohistochemical staining. (I) The number of Ki67positive cells in immunohistochemical staining injection than after MSC injection. (J) The number of caspase-3-positive cells in immunohistochemical staining was significantly

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

elevated at all time points in both groups. The number of caspase-3 positive cells at d21 was significantly elevated in saline injected LGs compared to MSC injected LGs. Data are n = 6, mean \pm SD; scale bar: 100 μ m. ****Represent p \leq 0.0001 compared to control; "represents p \leq 0.01 and """ represent p \leq 0.0001 compared between saline and MSC groups.

to control in both groups. In immunostaining, nestin expressing cells appeared as elongated, fibroblastic cells in the stroma of (damaged) LGs (Fig. S4). Number of nestin-positive cells were significantly increased after DL with 88.4 \pm 26.88 cells/mm² in saline and 87.33 \pm 17.64 cells/mm² in MSC injected LGs compared to control (28.4 \pm 11.87 cells/mm²; Fig. 4D). The number of nestin positive cells increased to 106.9 \pm 28.6 cells/mm² in saline and 97.76 \pm 20.18 cells/mm² in MSC injected LGs at day 5. Although the number of nestin cells decreased by day 21, it was still significantly increased when saline, but not MSC, was injected compared to control. These findings were additional confirmed by analysis of nestin expression in qPCR (Fig. S5).

Dynamic of LG damage and regeneration. LG damage and regeneration were investigated in HE stains, and vital acinar structures were identified and measured (Fig. 5A–F). In control LG, the acinar structures are tightly arranged, and only sparse connective tissue was found between the lobules (Fig. 5B). DL resulted in interstitial edema, infiltrating cells and shrunken acinar cell body with increased eosinophilia (Fig. 5C,E). Transplanted MSC could be detected in the stroma adjacent to the acinar structures (Fig. 5E dashed line, Fig. S4). Re-opening of the DL resulted in the reappearance of acinar structures and a decline of interstitial edema (Fig. 5D,F). Analysis revealed that vital acinar structures significantly decreased from $88.88\pm4.38\%$ in control to $1.86\pm0.96\%$ and $0.81\pm0.69\%$ in saline and MSC injected LGs, respectively (d0, Fig. 5A). Five days after saline injection and MCS transplantation the area of vital acinar structures was still significantly decreased (p < 0.0001). During 21 days of regeneration, vital acinar structures increased to $62.32\pm5.88\%$ after MSC transplantation, which was significantly enhanced compared to saline injection $(50.11\pm11.45\%, p=0.0039)$.

Analysis of MIST1, an acinus specific transcription factor, confirmed the loss of acinar cells during DL (Figs. 5G and S6A). The number of MIST1-positive cells decreased from 1205 ± 87.55 cells/mm² in control to 6.27 ± 5.42 and 6.93 ± 6.32 cells/mm² in saline and MSC injected LGs, respectively. MIST1-positive cells increased gradually and were comparable to control by day 21 with 1216 ± 145.1 and 1272 ± 77.21 cells/mm² after saline injection and MSC transplantation, respectively. The absence of MIST1 expression after DL was further confirmed by qPCR (Fig. 5H).

Damage and regeneration were further investigated by proliferating (Ki67) and apoptotic (caspase-3) cells. The number of Ki67-positive cells gradually increased after DL, up to day 5 to 2033 \pm 742 cells/mm² after saline injection and to 1201 \pm 180 cells/mm² after MSC transplantation (Figs. 51 and S6B), which was significantly more Ki67-positive cells in saline than in MSC injected LGs (p < 0.0001). The number of Ki67-positive cells normalized to control levels by day 21. The number of caspase-3-positive cells was significantly increased at all investigated time points and in both groups (p < 0.0001, Figs. 5] and S6C). However, at day 21 the number of caspase-3 cells was significantly lower after MSC transplantation than after saline injection (p < 0.0001).

Characterization of immune reaction. To investigate the immune reaction after DL, we performed immunostaining and western blot analysis of commonly infiltrating cell types and pro-inflammatory cytokines. Number of Ly6G-positive cells, a marker for (neutrophil) granulocytes, was significantly increased from 4.1 ± 4.8 cells/mm² in control to 186.9 ± 36.8 cells/mm² and to 157.7 ± 43.2 cells/mm² after saline and MSC injection (d0), respectively (Figs. 6A and S6D). Number of infiltrating Ly6G-positive cells remained high at day 5 in both groups (p < 0.0001, respectively), but decreased to control levels at day 21. Number of CD68-positive cells, a marker for monocytes and macrophages, was significantly increased at p = 0.0001.

Number of CD68-positive cells, a marker for monocytes and macrophages, was significantly increased at all investigated time points, both in saline and MSC injected LGs, compared to control (p < 0.0001, Figs. 6B and S6E). The number of CD68-positive cells increased from 43.1 \pm 16.5 cells/mm² in control to 268.3 \pm 42.8 cells/mm² after saline injection and to 228.2 \pm 72.3 cells/mm² after MSC transplantation (d0), which was significantly different when comparing the two treatment groups (p = 0.0073). Infiltration of CD68-positive cells further increased at day 5 to 826.3 \pm 72.3 cells/mm² after 0739.7 \pm 89.2 cells/mm² after saline and MSC injection, respectively. At day 5 the number of CD68-positive cells was significantly lower in MSC than in saline injected LG (p = 0.0005). By day 21 the number of CD68-positive cells significantly decreased in both groups compared to day 5 but was still significantly higher than in control.

Gene expression of TNF α raised 56.7 \pm 18.6-fold after saline injection and 26.95 \pm 8.3-fold after MSC transplantation, which was significantly up-regulated compared to control (Fig. 6C). Expression of TNF α was significantly higher after saline injection than after MSC transplantation (p < 0.0001). During regeneration, the expression of TNF α decreased and reached control levels by day 21. Although the expression of TNF α increased, no TNF α protein could be detected (Fig. 6D). Expression of TL-6, a widely described immune-modulatory cytokine secreted by MSC, was significantly increased at day 0 after MSC transplantation, but not after saline injection when compared to control (p = 0.0007; Fig. 6E). Thus, the expression of IL-6 was significantly higher in MSC than in saline group (p = 0.0037). However, no IL-6 protein could be detected (Fig. 6F).

Influence of MSC. In a previous study, we identified lipocalin-2 (Lcn2) and STAT1 in the secretome of MSC, contributing to the improvement of LG epithelial cell survival in vitro³⁶. Therefore, we analyzed whether transplanted MSC also secrete Lcn2 and/or STAT1 in vivo. Expression of Lcn2 was significantly increased 5 min (d0) after saline and MSC injection compared to control (p < 0.0001) and gradually decreased to control levels by d21 (Fig. 7A). Investigation on Lcn2 protein level also revealed a significant increase at d0 (p < 0.0001 saline injection

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5



Figure 6. Characterization of immune reaction in LG. (A) Number of Ly6G cells in IHC significantly increased after DL in saline and MSC injected LGs at d0 and d5 but normalized by d21. At d0 the number of Ly6G cells tended to be higher after saline injection than MSC injection. (B) Number of CD68 cells in IHC was significantly increased at all time points compared to control. The number of CD68 cells differed significantly between saline injection and MSC transplantation at 0 and d5. (C) TNF α expression in the LG was significantly increased after DL (d0) and was significantly higher after saline injection than After MSC injection. (D) TNF α could not be detected in western blot. (E) Expression of IL-6 in the LG was increased only at d0 after MSC injection, which was significantly different compared to saline injection. (F) IL-6 could not be detected in western blot. (E) Expression of IL-6 in the lG was increased in parallel. Full blots are provided in the supplementary data file. Data are n = 6, mean \pm SD. ***Represent $p \leq 0.001$ and **** represent $p \leq 0.001$ compared to control; "represents $p \leq 0.01$, ""represent $p \leq 0.001$ and **** represent p ≤ 0.001 compared between saline and MSC groups.

and p=0.0004 after MSC transplantation) with a return to baseline by day 21 (Fig. 7B,C). Expression of STAT1 increased at d0 in both groups and gradually declined over time (Fig. 7E). Protein levels of STAT1 α as well as STAT1 β were significantly increased at d0 in saline and MSC injected LGs (STAT1 α rp = 0.0127 saline, p=0.0552 MSC, STAT1 β p = 0.0316 saline, p=0.021 MSC) compared to control (Fig. 7D,FG). In saline injected LG the level of STAT1 α and STAT1 β decreased thereafter. In MSC injected LG the amount of STAT1 α and STAT1 β declined by d5 and was again significantly increased at d21 compared to control (STAT1 α ; p=0.0302, STAT1 β ; p=0.0241).

Discussion

ADDE, due to a loss of functional LG tissue, causes the most severe forms of DED²⁸. Current therapies remain palliative and even advanced therapies, like the transplantation of the SG can only ease the symptoms, but are insufficient to restore the physiologic composition of the tear film and to address the underlying loss of LG tisue²⁹. Therefore, this study evaluated a curative approach by investigating the therapeutic potential of LG-specific, extrinsic MSC transplantation to enhance LG regeneration in an experimental model of ADDE.

In the current study, MSC for transplantation were isolated by explant culture from mice that express eGFP in a constitutive and ubiquitous manner (eGFP-MSC). Recently, explant culture from mice that express eGFP in a constitutive and ubiquitous manner (eGFP-MSC). Recently, explant culture was identified as a suitable method to isolate a pure, specific and functional MSC population from the murine LG^{5,30}. The eGFP expression allowed the identification and tracking of transplanted MSC throughout the study. Nevertheless, genetic modification and ectopic expression of a transgene (eGFP) might alter the physiology of the cells. Therefore, eGFP-MSC were characterized and compared to results obtained from wildtype (wt) mice in previous studies^{4,50}, eGFP-MSC exhibited the characteristic fibroblastic morphology and growth behaviors comparable to that of wt-MSC^{12,05,90}. In addition, phenotypic characterization and differentiation capacity was comparable to that of MSC from other tissues^{23,31} and to that of wt-MSC^{12,05}. The genetic stability of eGFP-MSC was shown by a constant expression of nestin

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

а.



Figure 7. Influence of MSC. (A) Expression of Lipocalin-2 (Lcn2) significantly increased after DL (d0) and then gradually decreased to control level by d21 in both groups. (B,C) Western blot analysis of Lcn2. (B) Quantification of Lcn2 revealed a significant increase 5 min (d0), which decreased to control levels by d21 after saline and MSC injection. (C) Representative pictures of Lcn2 detection by western blot. (D) Representative pictures of STAT1 a/3 detection by western blot. (E) Expression of STAT1 slightly increased at d0 and d5. (F) Quantification of STAT1 a/3 detection by western blot. (E) Expression of STAT1 slightly increased at d0 and d5. (F) Quantification of STAT1 a/3 detection by western blot. (B) Expression after saline and MSC injection. (G) Quantification of STAT1 a revealed a slight increase at all time points after saline and MSC injection. For western blot analysis the samples (n = 42) were run on four blots, which were processed in parallel. Full blots are provided in the supplementary data file. Data are n = 6, mean ± SD. *Represent p \leq 0.001, ****represent p \leq 0.001 compared to control.

and eGFP over the entire timespan of the study (28 days). Overall, the results of the current study confirm that eGFP-MSC have the same properties than wt-MSC, can be tracked by a stable eGFP expression over 28 days and are therefore suitable for transplantation experiments.

A well-established model was used to induce severe ADDE in mice by ligation of the secretory duct of the LG, which has been shown to cause a profound loss of functional tissue in mice and rabbits, mimicking the tissue damage in patients with ADDE^{11,155}. The key feature of ADDE in patients, is the abated tear secretion^{22,230}. In the current study, a significant decrease of tear secretion confirmed the successful induction of ADDE, which was further proven by a loss of LG weight. In the course of ADDE, the reduced tear secretion causes damage to the ocular surface, which can be determined by a variety of dyes and a decreased thickness of corneal epithelium^{22,334,35}. Although DL had no macroscopic impact on the ocular surface in the current study, sisualized by fluorescein staining, the influence on the ocular surface was demonstrated by a decreased thickness of the corneal epithelium. Presumably, the period of reduced tear secretion in the mouse model was too short to cause a severe damage to the integrity of the corneal epithelium. In summary, the three-day DL resulted in clinical signs of acute ADDE with minpaired functional LG tissue and tear physiology with minor impact on the ocular surface and can therefore be used as a model to study in situ LG regeneration.

Transplantation of MSC has emerged as a promising approach to induce regeneration of a variety of tissues and a lot of clinical trials were implemented^{14,15,39}. A huge body of evidence indicates that MSC secrete trophic factors responsible for their induction of tissue repair. However, in addition to the secretion of trophic factors that affect tissue-resident progenitors or specialized tissue cells, it might be possible that MSC differentiate into the cells of the injured tissue and thereby replenish lost tissue¹⁴. In both cases, however, the engraftment of the MSC in the tissue of interest is a prerequisite for the successful induction of regeneration^{16,37}.

One of the main influences on the homing efficiency of MSC in the tissue of interest is the site of MSC delivery. In murine LG studies bone marrow MSC were applied either systemically³ or periorbital³⁹ and both resulted in improved LG function. Nevertheless, it is well known that cells can get trapped, e.g. in the lung, upon systemic transplantation^{14,37}. Therefore, the present study performed a locally intra-glandular injection and verified the presence of MSC within the LG. An additional major advantage of the current study was the use of traceable MSC, which was achieved by sex-mismatched transplantation of MSC isolated from male eGFP-expressing mice. This allows the detection of engrafted MSC by both their male DNA and their eGFP expression³⁹. Moreover, the

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

detection of a male specific sequence, such as *Rbmy*, can be used to calculate the absolute number of engrafted MSC⁴⁰. In the current study, tracking and calculation of MSC via *Rbmy* expression was done and their presence was further confirmed by the detection of eGFP in immunostaining. Accordingly, two independent tracking methods confirmed the presence of the transplanted, extrinsic MSC within the LG. The results showed that the number of MSC was high after transplantation and gradually decreased thereafter. Thus, transplanted MSC were present through acute inflammation of the LG and the initial phase of tissue repair. The LG is composed of acinar, ductal and myoepithelial cells, which assemble into functional units (the acini).

The LG is composed of acinar, ductal and myoepithelial cells, which assemble into functional units (the acini). With approximately 80% of the cells, acinar cells represent the most important cell type of LG. Acinar cells produce and secrete the perimary tear fluid which is a complex composition of inorganic salts, immunoglobulin A and various proteins such as lactoferrin, serum albumin, lysozyme and lipocalin^{2,41}. The loss of vital acinar structures therefore leads to reduced quality and quantity of tear secretion and results in the development of ADDE. In this study we were able to prove that tissue specific MSC transplantation significantly improves the regenerative capacity of damaged acinar structures. MSC transplantation resulted in the recovery of vital acinar structures to 62% of total LG tissue, which is an increase of 25% compared to spontaneous regeneration after saline injection. The demonstrated improvement in regenerative capacity is of great clinical relevance as age-related degradation processes and chronic inflammation seems to affect the intrinsic LG regenerative capacity and therefore the initiation and restoration of LG regenerative capacity is highly desirable.

The enhanced amount of vital acinar structures after MSC transplantation confirms the high therapeutic potential of extrinsic LG-MSC and suggests that a therapeutic benefit can be achieved if the intrinsic regeneration potential is not sufficient to reinstate LG function. Our results are in line with recently published data, who showed a sustained improvement of tear secretion and a reduced infiftrated LG area after systemically bone-marrow MSC transplantation in NOD mice with autoimmune-mediated chronic DED⁵.

The investigation of the intrinsic and extrinsic MSC detected by their nestin expression showed a high number on day 0 and 5, but only a low number on day 21. Differences were observed between the treatment groups, as the number of nestin positive cells on day 21 was still significantly increased after saline injection but not after MSC transplantation. Since MSC exert their therapeutic effects mainly in the initial phase of tissue regeneration, the differences in MSC count in the groups indicate that the transplantation of extrinsic MSC leads to a shortening of the initial phase of regeneration. These findings further support that MSC transplantation is beneficial for LG regeneration.

One of the main underlying causes leading to the loss of functional LG tissue and thus to the development of ADDE, is inflammation¹⁵. A variety of studies showed that DL resulted in an acute inflammatory reaction in SG^{42,43} and LG^{11,37}. In line with this, in our study a severe inflammatory reaction was also detected in form of a massive infiltration of neutrophils and macrophages at day 0 and day 5 and decreased at day 21. During this severe inflammatory reaction, the proportion of vital acinar structures is diminished and starts to regenerate when the inflammation decreases. Comparing the two treatment groups, the number of macrophages was higher at day 0 and lower at day 5 after MSC transplantation than after saline injection. This is presumably a result of the immune modulatory properties of transplanted MSC, since a variety of studies showed that MSC inhibit monocyte maturation and macrophage proliferation¹⁶. In general, it is assumed that modulation of the immune system is one of the key elements of MSC-mediated tissue repair¹⁷. One of the immunoregulatory factors secreted by MSC is IL-6, whose expression was highly upregulated upon MSC transplantation in this study. This indicates that the immunomodulation of transplanted MSC in this ADDE model also included the action of IL-6. Moreover, it was described that MSC inhibit the production/secretion of the TNFn^{44,0}. This is in line with the findings of the current study, where a decreased TNF α expression was detected after MSC transplantation. Overall, the results show that the transplantation of MSC resulted in a modulation of the inflammatory reaction in the LG after DL.

The gradual loss of MSC over time in conjunction with the enhanced tissue regeneration indicates that the therapeutic effects of MSC rather rely on the secretion of trophic factors than on differentiation towards LG acinar cells. Indeed, studies of glandular tissues, others than the LG, detected that MSC-secretome or MSC-derived extracellular vesicles had a similar therapeutic effect, on the ability to maintain/restore glandular function, than the MSC itself^{45–49}. Moreover, in recent studies it was shown that MSC conditioned medium had beneficial effects on injured LG epithelial cells in vitro^{3,30}. Among others, Lcn2 and STAT1 could be identified in the secretome of MSC and were found to positively affect the viability of injured LG epithelial cells in vitro³⁵. Therefore, the presence of these proteins was investigated in the current study.

Lcn2 expression and protein level were highly upregulated at day 0 and day 5 to comparable levels in saline and MSC injected LGs. As neutrophils also express Lcn2, it might be possible that the detected Lcn2 rather originated from the immune cells than from the implanted MSC[®]. This would coincide with the high numbers of neutrophils detected at day 0 in the current study and which were also comparable in both groups. This hypothesis is further supported by the results obtained from IL-1 induced ADDE, where Lcn2 was the mumber of MSC peaked at day 3^{12,19}. Nevertheless, Lcn2 could have contributed to the regeneration of the LG as an overexpression of growth factors, such as HGF[®]. Consequently, Lcn2 could, in parallel to its direct effect on LG epithelial cells, influence the MSC by enhancing their regenerative effects and thus contribute to LG regeneration. Since there was a higher number of MSC in the LG directly after transplantation, the effects of Lcn2 on the MSC could have a greater impact on the MSC transplanted LG than on the saline injected LG. Consequently, Lcn2 might contribute to the improved LG regeneration after MSC transplantation.

The only difference in the protein level of STAT1 between saline and MSC injected LGs was found at day 21, where STAT1 α/β was increased in MSC, but not saline injected LGs. In general, STAT1 signaling is complex and reveals somehow contrasting functions, which could be due to the large number of activating cytokines and receptors that signals through the JAK/STAT pathway as well as inducer-independent transcriptional activity of

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

STAT1⁵¹⁻⁵². Known STAT1 functions include the promotion of apoptosis, regulation of tissue remodeling, but also the stimulation of progenitor cells proliferation^{51,65-59}. Tissue remodeling after acute injury is complex and involves apoptosis of various cell types, and extracellular matrix (ECM) remodeling¹⁶. It has been shown that PDGF induced tissue remodeling, e.g. stimulated fibroblast proliferation, collagen secretion and increased ECM synthesis involve the activity of STAT1^{56,57}. The elevated STAT1 protein level on day 21 after MSC transplantation might therefore indicate that the MSC-injected LGs may enter the third phase of tissue repair - tissue remodeling. However, further studies have to confirm whether tissue remodeling occurs in the regenerating LG as soon as day 21.

In conclusion, this study revealed that the transplantation of LG-specific MSC significantly improved the regenerative capacity of LG in an ADDE mouse model. The significantly improved and accelerated regeneration after MSC transplantation compared to saline injection was demonstrated by a significant increase of vital acinar structures, a shortened presence of MSC in the LG, earlier decline of apoptic cells, a modulated macrophage invasion and a lower number of proliferating cells during acute inflammation, a lower expression of TNFo and an increased expression of IL-6. Thus, the use of extrinsic MSC appears to be a promising approach for the curative treatment of patients with severe DED/ADDE with impaired intrinsic LG regenerative capacity.

Methods

Mice. For transplantation experiments female C57BL/6J mice were obtained from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France). For the isolation of MSC, C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)100b/J (eGFP) were purchased from the Jackson Laboratory (Sacramento, CA) and further bred in the Central Animal Facility (Heinrich-Heine-University, Duesseldorf, Germany). Mice were kept under 12:12h light:dark cycle with food and water *ad libition*. All experiments were implemented in accordance with the "Association for Research in Vision and Ophthalmology" Statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, the national ethical committee for animal experimentation (FELASA guidelines) and were approved by the "Landesant für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen" (LANUV, IRB No. 84-02.04.2013.A268).

Mesenchymal stromal/stem cell isolation. MSC were isolated from male eGFP-mice (8–12 wk). After euthanasia extraorbital LGs were placed in cold culture medium (α -MEM, 2 mM L-glutamine, 15% FBS-S (all purchased from Biochrom, Berlin, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)). Before mincing with a scalpel, LGs were washed thrice with PBS (Sigma-Aldrich). Minced LGs were transferred to 10 cm culture dish and allowed to attach to the surface before culture medium was added.

Characterization of mesenchymal stromal/stem cells. MSC were characterized according to the defined criteria²⁴. LGs of 10 male eGFP-mice were used for each experiment.

Growth behavior and morphology were evaluated by inverse microscope observation and assessment of the cumulative population doubling (cpd) up to passage (p) 6.

Immunophenotyping was performed in p2 by using a CyAn ADP Flowcytometer (Beckman Coulter, Brea, CA), recording 10,000 viable single cells. In brief, detached cells were pre-incubated with anti-CD16/CD32 (BD Bioscience, San Jose, CA) for 5 min on ice. Thereafter, primary antibodies (see Table S1) were added and incubated for 30 min on ice. If intracellular staining was necessary, cells were fixed in 2% PFA for 30 min and permeabilized with 0.1% Triton-X-100 for 5 min and then proceeded as described above. Staining with the respectively labelled isotypes served as a control. Kaluza Software (Beckman Coulter) was used for analysis.

In vitro differentiation toward adipocytes and osteocytes was investigated in p3. In brief, 2500 cells/cm² were plated onto a 6 cm culture dish. Differentiation was induced when cells reached 70% confluency (osteogenesis) or 90% confluency (adipogenesis) by replacing the culture medium with osteogenic or adipogenic induction medium (see Roth et al.⁹). Differentiation was assessed after 7, 14 and 21 days by investigating the expression of osteopontin for osteogenesis or fatty-acid binding protein 4 (FABP4) for adipogenesis through qPCR. In addition, differentiation was visualized by staining with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) for osteogenesis and Oil-Red O (Sigma-Aldrich) for adipogenesis at day 21. Staining was performed according to manufacturer's instructions. Cells grown in culture medium served as control.

Surgery. Mice (8–10 wk) were anesthetizes using ketamine (80 mg/kg bodyweight (BW); Zoetis, Florham Park, NJ) and xylazine (7.5 mg/kg BW; Bayer, Leverkusen, Germany). Right extraorbital LG was exposed and the associated duct was ligated twice using a silicon tube (AS ONE Corporation, Osaka, Japan; see video 2 in Dietrich et al.¹¹). After 3 days, duct ligation (DL) was removed by reopening the silicon nodes and 2.5 × 10⁵ MSC in 2 µJ saline were injected into the LG using a 27-gauge needle (Hamilton syringe). Injection of saline (2 µJ) served as control. For transplantation experiments MSC were harvested 7 days after isolation. For analgesia, buprenorphine (0.05 mg/kg BW; Reckitt Benckiser, Slough, UK) was injected subcutaneously and tramadol (Hexal, Holzkirchen, Germany) added to the drinking water for 3 days at 1 mg/ml. The stitched wound was covered with Gentamicin ointment (5 mg/g, Ursapharm, Saarbrücken, Germany).

Experimental setup. Samples were collected 5 min, 5 days and 21 days after MSC transplantation or saline injection. Fluorescein staining and tear production was measured on the three time points (n = 12/time). For histological analysis, mouse eyes and LGs were excised (n = 6/time) and fixed with 4% PFA. For molecular biologic assessment, LGs (n = 6/time) were snap frozen in liquid nitrogen and RNA, DNA and protein purification was performed using the AllPrep DNA/RNA/Protein Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's manual.

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

Fluorescein staining of the ocular surface. Fluorescein staining was performed by applying 5 µl fluorescein (1.7 mg/ml Fluorescein SE, Alcon, Freiburg, Germany) to the lateral cantus of each eye. Excess solution was removed with PBS (Sigma-Aldrich). Eyes were examined using a slit lamp with a cobalt blue filter (PSL Classic, Keeler, Windsor, UK) and the defects were classified according to the Oxford Grading System.

Tear production. Tear production was measured using phenol-impregnated cotton threads (Zone-Quick, FCI Ophthalmics, Pembroke, MA). The threads were applied to the lateral canthus of both eyes for 60s using forceps. In contact with tears the threads turned red and tear production was measured in millimeters under a dissecting microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; Fig. 3A).

HE staining. To evaluate the thickness of the corneal epithelium, paraffin embedded sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). Three slides, and three sections per slide, of the middle eye at a distance of 10 slides were used. Sections were photographed with a microscope (DM40008, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), merged for an overview image and measured using Fiji software³⁶. To compare different areas of the cornea, three measuring points were defined: upper limbus (1), lower limbus (3) and the measured center between the two points (3, Fig. 3E).

For evaluation of LG structure and acini arrangement, pictures of HE stained whole LG were investigated using Fiji software¹⁹ and analyzed as previously described¹¹. In brief, vital and severely affected acini structures were measured, and each proportion calculated based on total LG area (set as 100%). Severely affected acini were identified by a shrunken cell body with eosinophilia and irregular arrangement of acini structures.

Immunohistochemistry. One central section (4µm) was used for DAB staining as described before¹¹. In brief, deparaffinized and rehydrated sections were subjected to antigen retrieval in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 35 min in a steam oven. Thereafter, sections were permeabilized with 0.15% Triton-X-100 for 10 min, followed by endogenous peroxidase quenching with 3% hydrogen peroxide for 30 min. Unspecific binding was blocked using 25% equine serum (Sigma Aldrich) with/without 0.25% BSA. For mouse-on-mouse staining, the sections were pre-incubated with Fab-Fragment for 1 h (Table S1). Primary antibodies were applied overnight at 4 °C (Table S1). Sections were then incubated with the corresponding biotinylated secondary antibody (Table S1) before immunoreactivity was detected using an avidin/peroxidase system with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate. Positive stained cells were counted in 20-fields of view using a graticule (grid 10 × 10 mm) in 400-fold magnification using a microscope (DM4000B, Leica) and cells per mm² were calculated.

Immunocytochemistry. MSC grown on slides were fixed using 4% PFA for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton-X-100 for 5 min before unspecific binding was blocked with 0.5% BSA. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C (Table S1). Cells were washed with PBS and incubated with the corresponding fluorescence-labelled secondary antibody (Table S1).

Ouantitative real-time PCR (qPCR). Amplification, including melting curve, was performed on a 96 well qPCR system (7500 Fast, Applied Biosystems). Duplicates of the six biological replicates were introduced for amplification with Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). No-template-samples served as controls. Expression was normalized to ribosomal protein S6 (RPS6) as endogenous control. Data analysis was performed according to Pfaffl and calculated as normalized relative fold expression level (RNQ)⁵⁹. Primer sequences are listed in the Supplementary Table S2.

For the assessment of MSC engraftment male genomic (g)DNA was analyzed in a 20µl real-time PCR. Primer pairs against TATA-box binding protein (TBP) were used as endogenous control and against RNA-binding motif protein on Y chromosome (*Rbmy*) to detect male-specific DNA (Table S2). Male mouse gDNA standards were generated adding 100, 50, 1, 0.5, 0.1, or 0.05 ng male gDNA to 100 ng female gDNA and were run along with the samples. To generate the standard curve, delta threshold cycles (CT) of standards were plotted against the concentration. Calculation of male gDNA per 100 ng introduced gDNA was performed according to Hong et al.⁴⁴. In brief, it is assumed that a mouse genome contains 3.4×10^5 base pairs (bp), leading to 6.8×10^5 bp for a diploid genome. In addition, a double-stranded DNA bp has a molecular weight of 645 Daltons (D), and 1 D is equal to 1.65×10^{-54} g. Consequently, the DNA content of a diploid mouse cell is 7.2 pg (6.8×10^5 bp × 645 D × 1.65×10^{-54} g).

Western blot. Protein samples (15µg) were denatured and separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, followed by semi-dry transfer to nitrocellulose membranes (Amersham, GE Healthcare, Chicago, IL). Membranes were blocked with 5% skim milk powder or 5% BSA in Tris-buffered saline. Primary antibodies were diluted in blocking buffer and incubate at 4°C overnight (Table S1). Horse-radish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. Chemiluminescence was developed using WesternBright Sirius HRP substrate (advansta, San Jose, CA) according to the manufacture's instruction and visualized using the ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA). For positive controls 40 ng recombinant murine IL-6 or TNF α (Peprotech, Rocky Hill, NJ) were run along with the samples. Total protein was stained with SYPRO Ruby according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Waltham, MA) and used for normalization. Analysis was performed using ImageLab 6.0.1 (Bio-Rad, Hercules, CA). Images of all blots can be found in Supplemental Material.

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

Statistics. GraphPad Prism 6 software (La Jolla, CA) was used for statistical data analysis. Values were given in means ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using ANOVA with Tukey or Dunnet post-hoc test. Differences with p \leq 0.05 were considered as significant.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this article, its supplementary information file or are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 13 May 2019; Accepted: 19 November 2019;

Published online: 04 December 2019

References

- Willcox, M. D. et al. TFOS DEWS II tear film report. Ocul. Surf. 15, 366-403 (2017).
- Windox, N., D. et al. (POS DEWS II leaf num report. Octal. Surf. 15, 369–405 (2017).
 Senn, A. J. et al. (TPOS DEWS II plashophysiology report. Octal. Surf. 15, 438–405 (2017).
 Sullivam, D. A. et al. (TPOS DEWS II sex, gender, and hormones report. Octal. Surf. 15, 384–333 (2017).
 Dietrich, J. et al. Development of counstive treatment strategies for lacrinum [gland insufficiency by tissue engineering and cell therapy. Part I: regeneration of lacrimal gland tissue: can we stimulate lacrimal gland renewal to vive? Curr Eye Res. 41, 1131–1142 (2016)
- (Aluri, H. S. et al. Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Teat Production in a Me Sjögren's Syndrome. Stem Cells Int. 2017, 1–10 (2017).

- Sjögren's Syndrome. Stem Cells Int. 2017, 1–10 (2017).
 Tran, S. D., Sumita, Y., Fang, D. & Hu, S. In Saltwary Gland Development and Regeneration: Advances in Research and Clinical Approaches to Functional Restoration (ed. Scungher Cha) 93–102 (Springer International Publishing, 2017).
 Qian, D. et al. Bone matrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) repair acute necrotized pancreatitis by secreting microRNA-9 to target the NF-uB1/p50 gene in rats. Sci. Rep. 7, 581 (2017).
 Roth, M. et al. The Influence of Oxygen on the Proliferative Capacity and Differentiation Potential of Lacrimal Gland–Derived Mesenchymal stem Cells. Invest. Ophthalmol. Viz. Sci. 56, 4741–4752 (2015).
 Yon, S., Kublin, C. L., Avidan, O., Miyasaki, D. & Zoukhri, D. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. Invest. Ophthalmol. Viz. Sci. 58, 2749–2759 (2012).
 Shatos, M. A., Hangaard-Kedstrom, L., Hodges, R. R. & Darit, D. A. Isolation and characterization of progenitor cells in uninjured, adult rat lacrimal gland. Invest. Ophthalmol. Viz. Sci. 53, 2749–2759 (2012).
 District. J. et al. Commentation of the communic of lacrimal adult and characterization and recentration and progenitor cells in uninjured, adult rat lacrimal gland. Invest. Ophthalmol. Viz. Sci. 53, 2749–2759 (2012).

- adult rat lacrimal gland. Invest: Ophthetinel. Viii. Sci. 53, 2749–2759 (2012).
 Dietrich, J. et al. Comparative analysis on the dynamic of lacrimal gland damage and regeneration after Interleukin-1cs or duct ligation induced dry eye disease in mice. Exp. Eye Res (2018).
 Zoukhri, D., Fix, A., Alroy, J. & Kublin, C. L. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. Invest: Ophthalemol. Viii. Sci. 49, 4999 (2008).
 Liu, Y., Hirayama, M., Kawakita, T. & Tsubota, K. A Ligation of the Lacrimal Excretory Duct in Mouse Induces Lacrimal Gland Inflammation with Predictive Cells. Steen Cells in 2017 (2017).
 Squillaro, T., Peluso, G. & Galderiat, U. Chrisal trials with mesenchymal stem cells: an update. Cell Transplant. 25, 829–848 (2016).
 Xi, J., Yan, X., Zhou, J., Yue, W. & Pei, X. Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: progress and future. Baens & Transplant. 13 (2013).
- Trauma 1, 13 (2013).
 16. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 8, 726 (2008).
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymial stem cells in heidth and disease. Nat. Rev. Immunol. 8, 726 (2008).
 Gao, E. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. Cell Deadh Disc, 7, 20162 (2016).
 Guartner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. Nature 453, 314–321 (2008).
 Handey, D. et al. RNA-Seq and CyTOF immuno-profiling of regenerating lacrimal glands identifies a novel subset of cells expressing muscle-related proteins. PLoS One 12, e0179385 (2017).
 Doerr, W. & Quadheck, G. Allgemetier Pathologie, Vol. 68 (Springer-Verlag, 1970).
 Domitrieva, R. L. et al. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. Cell and 11, 377–312 (2012).

- Dmitrieva, R. L. et al. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell cycle* 11, 577–383 (2012).
 Al-Nbaheen, M. et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev. Rep* 9, 32–43 (2013).
 Wagner, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33, 1402–1416 (2005).
 Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
 Wiese, C. et al. Nextin expression a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell. Mol. Life Sci* 61, 2510–2522 (2004).
 Districh, J. et al. Analysis of lacrimal gland derived mesenchymal stem cell screetome and its impact on epithelial cell survival. *Stem Cell Res.* 38, 101477 (2019).
 Wiesel, TFOS DEWS II diagnostic methodology report. *Cruf. Surf.* 15, 539–574 (2017).

- Cell Res. 38, 101477 (2019).
 Wolffsohn, J. S. et al. TFOS DEWS II diagnostic methodology report. Ocul. Surf. 15, 539–574 (2017).
 Craig, J. P. et al. TFOS DEWS II definition and classification report. Ocul. Surf. 15, 276–283 (2017).
 Craig, J. P. et al. TFOS DEWS II report executive summary. Ocul. Surf. 15, 802–812 (2017).
 Craig, J. P. et al. TFOS DEWS II report executive summary. Ocul. Surf. 15, 802–812 (2017).
 Masina, R., Bekchanova, E. & Sukhild, G. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues, Bull. Exp. Net Jone Const. Biol. Mol. 139, 504–509 (2005).
 31. Seeberger, K. L. et al. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. Lab. Invest. 86, 141–153.
- (2006)

- Lin, H., Liu, Y., He, H., Botsford, B. & Yiu, S. Lacrimal Gland Repair after Short-term Obstruction of Excretory Duct in Rabbits. Sci. Rep. 7, 8290, https://doi.org/10.1038/s41598-017-08197-2 (2017).
 Bandouin, C. *et al.* Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. Br. J. Ophthalosol. 98, 1168–1176 (2014).
 Cui, X. *et al.* Assessment of corneal epithelial thickness in dry eye patients. Optom. Vis. Sci. 91, 1446 (2014).
 Erdelyi, B., Kraak, R., Zhivov, A., Guthoff, R. & Németh, J. In vivo confocal laser scanning microscopy of the cornea in dry eye. Graefor Arch Chin Exp. Ophthalosof 245, 39–44 (2007).
 U.S. Michaul bettering of Uncher. of Uncher.
- 36. U.S. National Institutes of Health.
- Karp, J. M. & Teo, G. S. L. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell stew cell 4, 206–216 (2009).
 Lee, M. J. et al. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye.
- Moi. Ther. 23, 139–146 (2015).
 39. Terrovitia, J. V., Smith, R. R. & Marbán, E. Assessment and optimization of cell engrafiment after transplantation into the heart. Circul. Res. 106, 479–494 (2010).
- Hong, K. U. *et al.* A highly sensitive and accurate method to quantify absolute numbers of c-kit+ cardiac stem cells following transplantation in mice. Basic Res. Carolol. 108, 346 (2013).
 Zhou, L. *et al.* Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry. Ann Acad Med Singapore 35, 400 annual statements.
- (2006)

SCIENTIFIC REPORTS | (2019) 9:18299 | https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5

- 42. Correia, P. Caroenter, G. Osailan, S. Paterson, K. & Proctor, G. Acute salivary gland hypofunction in the duct ligation model in the
- Service of inflammation. Oral Dis. 14, 520–528 (2008).
 Woods, L. T. et al. Increased expression of TGF-3 ingraling components in a mouse model of fibrosis induced by submandibular gland duct ligation. *PLoS One* 10, e0123641 (2015). 43. Wo
- Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 105, 1815–1822 (2005).
- 45. Hackstein, H. et al. Prospectively defined murine m nchymal stem cells inhibit Klebsiella pneumoniae-induced acute lung injury
- and improve pneumonia survival. Respir. Res. 16, 123 (2015).
 46. An, H.-Y. et al. Adipose mesenchymal stem cell secretome mod damage. PLoS One 10, e0141862 (2015). odulated in hypoxia for remodeling of radiation-induced salivary gland 47. Shigemoto-Kuroda, T. et al. MSC-derived extracellular vesicles atten ate immune responses in two autoimmune murine models.

- Snigernoto-Kuroda, 1. et al. MSC-derived extracellular vesicles attenuate immune responses in two automatume marine modelic-type 1 diabetes and userentinitis. Sizem Cell Rep. 8, 1214–1225 (2017).
 Lim, J.-Y. et al. Intraglandular transplantation of bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells for amelioration of post-tradiation salivary gland damage. Oral Oxcol 49, 136–143 (2013).
 Flo, T. H. et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature 432, 917 (2004).
 Halabian, R., Tehrani, H. A., Jahanian-Najafabadi, A. & Roudkenar, M. H. Lipocalin-2-mediated upregulation of various antioxidiants and growth factors protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against unfavorable microenvironments. Cell Stem Chancemer 18, 785–800 (2013). Cell Stress Chaperones 18, 785–800 (2013). Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H. & Stark, G. R. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. Oncogene
- 51. 19, 2619 (2000)
- Marray, P. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol 178, 2623–2629 (2007).
 Wang, H. et al, STAT1 activation regulates prohiferation and differentiation of renal progenitors. Coll. Signal. 23, 1717–1726 (2010).
 Song, H. Y., Jeon, E. S., Jung, J. S. & Kim, J. H. Oncostatin M induces prohiferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Int. J. Boolem. Coll Biol. 37, 2357–2365 (2005).
- Hu, X. & Ivashiav, L. B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-y: implications for immune respondiseases. *Journal*, 539–550 (2009).
- 56. Sun, Q. et al. PDGF-BB induces PRMT1 expression through ERK1/2 dependent STAT1 activation and regulates remodeling in San, Q. et al. PDVP-B8 induces reast 1 expression introduct arXiv:12 dependent 51rtl activation and regulates remotal primary human lung fibroblasts. Col. Signal 28, 307–315 (2016).
 He, C. et al. STAT1 modulates tissue wasting or overgrowth downstream from PDGFRJ. Genes Dev 31, 1666–1678 (2017).
 Schindelin, J. et al. Fijt: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods 9, 619–619, 2020.
 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 29, e45 (2001).

Acknowledgements

The authors would like to thank Felicitas Jahnel and Christina Neumann for excellent technical assistance (Laboratory of Experimental Ophthalmology, University Hospital Duesseldorf). This work was supported by the Volkswagen Foundation (Lichtenberg Professorship of Prof. Dr. Dr. S. Schrader). In addition, the authors would like to thank the committee members who awarded the current project with the sicca advancement award 2018 donated by "Bausch + Lomb" as well as the committee members of the "Universitätsgesellschaft Oldenburg e.V." who honored the project with a congress scholarship.

Author contributions

J.D., M.R., S.M. and S.S. conception and design; J.D., L.O. and J.W. experiments and collection of data; J.D., L.O. and J.W. preparation of the manuscript; J.D. manuscript writing; S.S. financial support; S.S. and G.G. final approval of the manuscript; All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

LD., L.O., M.R., I.W., G.G., S.M. and S.S. declare no financial or non-financial competing interests relevant to this article.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-54840-5.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

@ The Author(s) 2019

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Stefan Schrader für die Möglichkeit einer Promotion in seiner Arbeitsgruppe, seine Unterstützung und sein Vertrauen in mich. Auch meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. Charlotte von Gall danke ich von Herzen für die Übernahme dieser Funktion sowie als Gutachterin.

Ich danke vielmals der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) für die Auszeichnung mit dem Forschungspreis für medizinische Doktoranden auf dem Gebiet der Augenheilkunde. Ohne diese großzügige finanzielle Unterstützung wäre meine Promotion nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich auch in aller Ausdrücklichkeit bei Dr. Sonja Mertsch bedanken, die mich in ihrer Mentorenrolle bei allen wissenschaftlichen Belangen unterstützt hat. Zudem danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Ophthalmologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und den regen, motivierenden Austausch.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mentorin, Dr. Jana Dietrich, die mir mit stetiger Unterstützung, Ideen und motivierenden Gesprächen zur Seite stand. Ohne ihre Hilfsbereitschaft und ihr ausgesprochenes Engagement könnte ich mir die Vollendung dieser Arbeit nicht vorstellen.

Mein größter Dank geht an Falko Rug. Danke für deine motivierenden Worte, deinen Humor und dein selbstverständliches Vertrauen in mich.