

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Professor Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)

**Proteinkonzentrationen im humanen okulären Surfactant
System und deren Einfluss auf das Trockene Auge**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Posa
geboren am 13.04.1983 in Karl-Marx-Stadt

Betreuer: Professor Dr. med. Friedrich P. Paulsen
Professor Dr. rer. nat. Lars Bräuer

Gutachter: Prof. Dr. F. Paulsen, Institut für Anatomie 2, FAU Erlangen-Nürnberg
Prof. Dr. S. Knipping, HNO, Klinikum Dessau
Prof. Dr. I. Bechmann, Institut für Anatomie, Universität Leipzig

Eröffnungsdatum: 17.07.2012

Verteidigungsdatum: 11.03.2013

Referat

Die vorliegende Dissertation untersucht die funktionelle Bedeutung der Surfactant - Proteine (SP) A, B, C und D im Augen- und Tränensystem im Rahmen der Pathogenese des Trockenen Auges (TA) beim Menschen. Der Augen- und Tränenapparat unterliegt einer Vielzahl von exo- und endogenen Einflüssen, was ein funktionelles Abwehr- und Schutzsystem zur Protektion vor Erkrankungen nötig macht. Mit mehr als elf Millionen Betroffenen allein in Deutschland, gehört das TA zu den häufigsten, chronischen Erkrankungen der Augenoberfläche, bei dem es über eine verminderte Produktion und / oder eine gestörte Zusammensetzung der Tränen zu Beeinträchtigungen der physiologischen Benetzung der Augenoberfläche kommt, mit objektiven und subjektiven Symptomen und folglich zu Einschränkungen der Lebensqualität. Durch Western-Blot-Analysen konnte der von Bräuer et al. (2007) erbrachte Nachweis aller bisher bekannten SP's für die Tränendrüse und Tränenflüssigkeit bestätigt werden. Die für die Lunge bereits sehr gut untersuchten oberflächenaktiven (SP-B/SP-C) und immunologischen (SP-A/SP-D) Funktionen sind bislang für das Auge nur vermutbar, könnten aber für die physiologischen Prozesse sowie für diverse Pathologien am Auge bedeutsam sein. Mittels Gesamtproteinbestimmung nach Bradford, Gel- und Membrananfärbungen (Coomassie, Silbernitrat bzw. Ponceau) sowie Western-Blot-Analysen kann gezeigt werden, dass sich der Schirmer-Streifen als ein nicht invasives, schonendes, molekularbiologisches Quantifizierungssystem eignet, um hydro- wie auch lipophile Proteine unterschiedlichsten Molekulargewichtes in Tränen quantitativ und qualitativ zu untersuchen. So konnten mittels Schirmer-Streifen Tränen von 306 Probanden generiert, sowie durch ELISA-Analysen gezeigt werden, dass bei einem TA alle vier SP's heraufreguliert sind. Zur Erhebung anamnestischer Daten wurde ein Fragebogen erstellt und eingesetzt. Er zeigt, dass besonders Frauen und Personen ≥ 40 Jahre vermehrt am TA leiden. Durchschnittlich waren sie 10 Jahre älter (60 Jahre) als ihre gesunde Vergleichsgruppe und zeigten im Schirmer-I-Test eine Reduktion der Tränenmenge sowie nach Bradford eine Abnahme der darin enthaltenen Proteinmenge. Zukünftig sollte analysiert werden, wie Veränderungen im Proteinhaushalt und im okulären-Surfactant-System zu Beeinträchtigungen am Augen- und Tränenapparat führen und somit potentielle Auslöser für Erkrankungen der Augenoberfläche darstellen, um diesen mit möglichen neuen Therapieoptionen zu begegnen.

Posa, Andreas: Proteinkonzentrationen im humanen okulären Surfactant System und deren Einfluss auf das Trockene Auge.

Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Die Physiologie der Augenoberfläche	1
1.2 Das Trockene Auge	3
1.3 Die Surfactant - Proteine	10
2 Material und Methoden	13
2.1 Eingesetzte Materialien und Chemikalien	13
2.1.1 Allgemeine Materialien	13
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Chemikalien	14
2.1.4 Molekulargewichtstandard	14
2.1.5 Gebrauchslösungen	15
2.1.6 SDS - Gele	16
2.1.7 Kits und Enzyme	16
2.1.8 Sterilisation von Lösungen und Geräten	16
2.2 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	17
2.2.1 Allgemeines Vorgehen	17
2.2.2 Probandenfragebogen	18
2.2.3 Proteinisolierung aus Gewebeproben	19
2.2.4 Entnahme von Tränenflüssigkeit am lebenden Probanden mittels Schirmer - Streifen und Kapillare	19
2.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford	21
2.4 SDS - Gelelektrophorese	22
2.5 Western - Blot	23
2.6 Färbungen	24
2.6.1 Coomassie - Brillant - Blue G - 250	24
2.6.2 Silbernitrat	24
2.6.3 Ponceau - S - Rot	24
2.7 Enzym - Linked - Immuno - Sorbent - Assay (ELISA)	24
2.8 Statistik	25

3	Ergebnisse	26
3.1	Western - Blot - Analysen zum Nachweis der Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit auf Proteinebene	26
3.2	Vergleichende Analysen der Entnahmetechniken (Kapillare vs. Schirmer - Streifen) in Bezug auf die Gewinnung von Tränenflüssigkeit und deren Potential zur Untersuchung von Proteinen unterschiedlichster Eigenschaften	26
3.2.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford in Tränen aus Kapillare und Schirmer - Streifen	26
3.2.2	Proteinnachweis in Tränenflüssigkeit nach SDS - Gelelektrophorese durch Gel- und Membrananfärbung	27
3.2.3	Western - Blot - Analysen zum Nachweis der Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D in Tränenflüssigkeit aus Kapillare und Schirmer - Streifen	27
3.3	Auswertung der Probanden - Daten	28
3.3.1	Die statistische Auswertung der anamnestischen Befragung von 306 Probanden mit und ohne Trockenes Auge	28
3.3.2	Die graphischen Analysen der Probandendaten in Bezug auf die Verteilung von Geschlecht, Alter, symptomatischen Beschwerden eines Trockenen Auges, der gespendeten Tränenmenge und der Gesamtproteinkonzentration	32
3.3.3	ELISA - Auswertung zur Beurteilung der Rolle des okulären - Surfactant - Systems in der Pathogenese des Trockenen Auges	41
4	Diskussion	44
4.1	Nachweis der Surfactant - Proteine A, - B, - C und - D in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit	44
4.2	Kapillare und Schirmer - Streifen: Verfahren zur Gewinnung von Tränen lebender Probanden und zur Erforschung der darin enthaltenen Proteine	44
4.3	Einflussfaktoren auf die Pathogenese des Trockenen Auges	45
4.3.1	Alter und Geschlecht	46
4.3.2	Atemwegserkrankungen	48
4.3.3	Irritative Einflüsse auf das Auge	48
4.3.4	Gynäkologische Erkrankungen - Myom	49
4.3.5	Hauterkrankungen - Trockene Haut	49

4.3.6	Herz - Kreislauf - Erkrankungen	49
4.3.7	Erkrankungen des Verdauungssystems	50
4.3.8	Osteoporose	51
4.3.9	Depression	52
4.3.10	Erkrankungen der Schilddrüse	52
4.3.11	Stoffwechselerkrankungen	52
4.3.12	Erkrankungen der Niere	53
4.3.13	Allergien	53
4.4	Symptomatisches Beschwerdebild beim Trockenen Auge	54
4.5	Gespendete Tränenflüssigkeit im Schirmer - I - Test	54
4.6	Bestimmung des Gehaltes an Gesamtprotein in μg pro μl Tränenflüssigkeit	55
4.7	Die Rolle der Surfactant - Proteine beim Trockenen Auge	58
4.7.1	Die hydrophilen Surfactant - Proteine SP - A und SP - D	58
4.7.2	Die hydrophoben Surfactant - Proteine SP - B und SP - C	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Thesen	77
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	
	Danksagung	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADDE	Aqueous Tear Deficient Dry Eye
AIDS	Acquired ImmunoDeficiency Syndrome
AK	Antikörper
AM	Arzneimittel
AMP	AntiMikrobielles Peptid
ANCA	Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper
APS	AmmoniumPersulfat
ARDE	Age Related Dry Eye
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
BAC	BenzAlkoniumChlorid
BALT	Bronchus - Associated Lymphoid Tissue
BPI	Bactericidal Permeability Increasing Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Circa
CALT	Conjunctiva - Associated Lymphoid Tissue
CAP 37	Cationic Antimicrobial Protein - 37
CAT	Cationic Amino Acid Transporter
CVS	Computer Vision Syndrome
DEWS	Dry Eye Workshop
D	Deutschland
Dipl.	Diplom
Dr.	Doktor
Dt.	Deutsch
ECL	Enhanced Chemoluminescence Methode
EDE	Evaporative Dry Eye
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF	Endothelial Growth Factor
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
GVHD	Graft Versus Host Disease
HEV	High Endothelial Venules
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HTLV	Humanes T - Cell Lymphotropic Virus
IAZ	Institut für Anatomie und Zellbiologie
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
KCl	KaliumChlorid
kDa	KiloDalton
LASIK	Laser In Situ Keratomileusis
LEAD	Leber Exprimiertes Antimikrobielles Peptid
LFU	Lacrimal Functional Unit
LINE	LASIK Induced Neuro Epitheliopathy
LL 37	humanes antimikrobielles Peptid / h CAP 18
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MAP	Mitogen Activated Protein
MGD	Meibomian Gland Disease
MHC	Major Histocompatibility Complex

Min	Minute
MLU	Martin Luther Universität
Mm	Millimeter
MMP	Matrix MetalloProteinase
MUC	Mucin
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Nervus
NaCl	NatriumChlorid
NEI	National Eye Institute
NFκB	Nuclear Factor 'Kappa - light - chain - enhancer' of activated B - cells
NSSDE	No Sjögren Syndrome Dry Eye
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCB	PolyChloriertes Biphenyl
PGE	Prostaglandin E
PGI	Prostaglandin I / Prostacyclin
PRK	PhotoRefraktive Keratektomie
PVA	PolyVinylAlcohol
PVP	PolyVinylPyrrolidon
RK	Radiäre Keratotomie
RPM	Rounds Per Minute
S	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SP	Surfactant Protein
SSDE	Sjögren Syndrome Dry Eye
TA	Trockenes Auge
TALT	Tear Duct - Associated Lymphoid Tissue
TGF	Tissue Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
U.a.	unter anderem
V.a.	vor allem
VIP	Vasoaktiv Intestinales Polypeptid

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Die Physiologie der Augenoberfläche

Als eines der kleinsten Organe stellt das Auge nicht nur ein wesentliches Sinnes-, sondern auch ein zentrales Ausdrucksorgan dar. Aufgrund seines ständigen Kontakts mit der Umwelt unterliegt es einer Fülle von Einflüssen. So nimmt es über 90 % aller Umweltreize auf und beansprucht für sich mehr als 40 % aller Leitungsbahnen des zentralen Nervensystems [1]. Zum Schutz dieses komplexen Systems sind funktionelle Abwehr- und Schutzmechanismen unerlässlich. So dienen Wimpern, Augenlider und -brauen, als Anhangsgebilde des Auges, dem Schutz vor Umwelteinflüssen wie Fremdpartikeln, Licht, Wind oder einer körperfremden Flora. Des Weiteren wirkt ein komplexes Gemisch aus einer Vielzahl an antimikrobiell wirkenden Substanzen protektiv. Diese Substanzen werden im Tränenapparat oder an der Augenoberfläche entweder konstitutiv gebildet (z.B.: humanes beta - Defensin 1, Laktoferrin, Lysozym) [2, 3] oder nach mikrobieller Stimulans (mikrobielle Bestandteile oder Stoffwechselprodukte) freigesetzt [4]. Dabei unterscheidet man ein angeborenes / unspezifisches von einem erworbenen / spezifischen Immunsystem.

Die parasympathisch über den N. intermedius des N. facialis stimulierte Sekretion von 0,5 cm³ Tränen pro Tag führt über eine kontinuierliche Absonderung aus den Tränenrüsen und den akzessorischen Tränendrüsen sowie dem 10 - 14 mal pro Minute reizlos, reflektorischen Lidschlag zur gleichmäßig physiologischen Benetzung der Augenoberfläche [5]. Schon Anfang des vergangenen Jahrhunderts gab es zahlreiche Arbeiten zur physiologischen Menge an produzierter Tränenflüssigkeit [6 - 8]. Die Basissekretionsrate beträgt etwa 0,5 - 0,8 mg pro Minute (1 - 2 µl / Min.), wobei das Volumen der Tränenflüssigkeit von 5 - 10 µl, bei einer Umsatzrate von 10 - 15 % pro Minute am Tag ca. 15 mal komplett erneuert wird, was täglich einem Gesamtvolumen von 300 - 400 ml entspricht [9]. Bei Reizung kann dies mit ca. 300 µl pro Minute als Reflexsekretion auf ein Hundertfaches gesteigert werden [10]. Zu einer Reduktion der Tränenproduktion kommt es physiologisch zum Beispiel während des Schlafes, aber auch nach anästhesiologischen Eingriffen am Auge [5].

Die Tränenflüssigkeit ist ein klares, hypotones Ultrafiltrat des Blutplasmas. Sie besteht zu ca. 98 % aus Wasser. Die restlichen ca. 2 % beinhalten gelöste Proteine (Enzyme, Zytokine), Lipide, Elektrolyte, Muzine, Stoffwechselmetabolite, abgeschilferte Epithelzellen und Fremdstoffe aus der Umgebungsluft [11]. Physiologisch hat die Tränenflüssigkeit einen pH von 7,14 - 7,82, eine Temperatur von 35 °C, eine Osmolarität von 296 - 308 mOsm und einen osmotischen Druck von 311 - 350 mOsmol / kg [12].

Die Tränenflüssigkeit ist ein komplexes Flüssigkeitsgemisch aus etwa 500 Proteinen [13] und übernimmt eine Vielzahl an Aufgaben. So leitet der Tränenfluss Partikel von der Augenoberfläche in den Tränen - Nasen - Gang und letztendlich über den unteren Nasengang in die Nase. Der Tränenfilm übernimmt eine antimikrobielle Barrierefunktion und schützt durch eine gleichmäßige Befeuchtung der Augenoberfläche vor deren Austrocknung. Die Tränenflüssigkeit sorgt für das reibungsarme Gleiten der Augenlider über das Auge, gleicht kleinere Unebenheiten auf der Augenoberfläche aus und verbessert die optischen Eigenschaften der Hornhaut, indem sie für eine optisch glatte Oberfläche am Luft - Augen - Übergang sorgt und somit in der Brechung des Lichtes eine wichtige Rolle einnimmt. Zudem unterstützen Tränen als einzige Nährstoffquelle für die gefäßlose Hornhaut durch Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen, den aeroben Stoffwechsel.

Der Tränenfilm zeigt je nach Verdunstung und Reizsekretion eine starke Schwankung im Durchmesser. Physiologisch ist der Tränenfilm ca. 3 - 40 µm dick [14] und zeigt dabei eine gewisse Dreischichtung auf. Die innere Schleimphase (Hydrogel) wird von den Becher- (Goblet-) zellen der Bindehaut, den Henle - Krypten und akzessorischen Manz - Drüsen gebildet und geht fließend in die mittlere Phase über. Sie beinhaltet u.a. die von Cornea und Konjunktiva gebildeten membrangebundenen Muzine (MUC) 1, 4 und 16 die eine Adhäsion von Zellen und Mikroorganismen an das Epithel behindern [15], aber auch die sekretorischen Muzine (MUC) 5AC (konjunktivale Becherzellen) sowie MUC 5B und MUC 7 (Tränendrüse) [16]. Die Muzinphase ist hoch viskös, kaum beweglich und durch den Lidschlag nicht zu entfernen. Sie haftet an der Epithelaußenschicht über Mikroplicae, auf denen die membrangebundenen Muzine befestigt sind. Letztere verleihen dem hydrophoben Hornhaut- und Bindehautepithel eine glatte hydrophile Oberfläche. So kann sich die wässrige Komponente des Tränenfilms durch eine verminderte Oberflächenspannung gleichmäßig über die Augenoberfläche ausbreiten und diese benetzen. Die mittlere wässrige Komponente stammt zu 95 % aus den Haupttränendrüsen Glandulae lacrimales. Die restliche Menge von den akzessorischen Krause - und Wolfring - Tränendrüsen. Sie besteht aus Wasser (98 %), Elektrolyten, Metaboliten, Abwehrzellen und Proteinen und dient der Versorgung der Hornhaut, dem Transport von Metaboliten / Fremdkörpern, der Reinigung der Augenoberfläche, sowie der Kontrolle der Bakterienflora [17]. Die äußere Lipidkomponente entstammt hauptsächlich den Meibom - Drüsen der Augenlider und schützt vor Verdunstung (um bis zu 95 % [18]). Ferner schützt sie vor Tröpfcheninfektion, fettet die Lidkanten, verhindert den Abfluss von Tränen über die Lidkante und stabilisiert so den Tränenfilm. Bei 80 % der von einem Trockenen Auge Betroffenen kommt es zu Störungen in dieser Phase [19].

1.2 Das Trockene Auge

Das Trockene Auge ist eine der häufigsten Diagnosen beim Augenarzt (ca. jeder dritte Patient [20]). Laut dem DEWS - Report von 2007 handelt es sich hierbei um *eine multifaktorielle Erkrankung der Tränen und Augenoberfläche, die zu Beschwerdesymptomen, Sehstörungen, und Träneninstabilität, mit möglicher Beschädigung der Augenoberfläche führt. Sie wird von einer erhöhten Osmolarität des Tränenfilms und Entzündungen der Augenoberfläche begleitet* [14]. Obwohl diese Definition okuläre Symptome beinhaltet, gibt es subjektiv asymptomatische Patienten, jedoch mit objektiven Eigenschaften eines Trockenen Auges, für die ebenfalls diese Diagnose gestellt werden muss. Es kommt zu einer Störung der Tränenfunktionseinheit (LFU), bestehend aus Tränendrüse, Augenlidern, Augenoberfläche (Bindehaut, Hornhaut und Meibom - Drüsen), sowie motorischen und sensorischen Nerven, was die Integrität des Tränenfilms, die Transparenz der Hornhaut, sowie die Qualität des auf die Netzhaut projizierten Bildes gefährden und somit die Interaktion mit der Umwelt sowie endokrinologische und kortikale Regelkreisläufe beeinträchtigen kann [21, 22].

Es wurden eine Vielzahl unterschiedlichster Tests zur Diagnose und Überwachung eines Trockenen Auges entwickelt. Laut DEWS 2007 erlaubt aber momentan kein einzelner eine zuverlässige Diagnose. Als Ursachen für eine mangelnde Korrelation zwischen Testergebnis und Augensymptomatik werden eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der vorhandenen Tests, die individuelle Variabilität der Erkrankung in Form ihrer zahlreichen Untergruppen und Stärken, das subjektive Empfinden sowie eine relative Hornhautanästhesie im Alter angegeben [14]. So ist eine sichere und einheitliche Diagnose schwierig und die Zahl der Betroffenen nur schwer zu erfassen, was u.a. in der Melbourne - Studie deutlich wurde. Je nach Test ergaben sich für ein Trockenes Auge Häufigkeiten von 1,5 - 16 % [20]. Dabei lassen sich erste Hinweise auf diese Erkrankung schon mit geringem zeitlichen und apparativen Aufwand feststellen. Etwa durch eine gezielte Anamnese anhand eines Symptomfragebogens, da es sich hier vor allem um eine symptomatische Erkrankung handelt, mit zum Teil hohem subjektiven Leidensdruck [23].

In Amerika schätzt man die Zahl der Betroffenen auf etwa 5 Millionen, wobei die Rate der Betroffenen mit dem Alter ansteigt und Frauen stärker betroffen sind als Männer [24, 25]. Dabei sollte man berücksichtigen, dass die Tendenz zur Symptomberichterstattung bei Frauen höher ist [26]. In Mitteleuropa sind etwa 10 - 20 % der Normalbevölkerung betroffen [27]. Die Dunkelziffer dürfte weitaus höher liegen, da Betroffene mit milder oder episodenhafter Symptomatik hier nicht mit erfasst wurden.

In einer global alternden Gesellschaft hat eine Zunahme von Erkrankungen mit dem Alter auch ökonomische und gesundheitspolitische Relevanz. Sowohl auf direkter, als auch auf indirekter Kostenebene [28]. Nach Ellwein et al. stieg die Inzidenz von 1991 bis 1998 um 57,4 % [29]. Die weit aufgefächerte Prävalenzspanne reicht, je nach Definition, Unterschieden bei diagnostischen Tests und Design der jeweiligen Studie, von 0,39 bis über 35 % [20]. Wobei asiatische und hispanische Frauen im Vergleich zu Kaukasierinnen eine erhöhte Prävalenz aufzeigen [30].

Die Ätiologie für ein Trockenes Auge ist multifaktoriell und in Abbildung 1 vereinfacht zusammengefasst. Grundsätzlich können innere, wie auch äußere Faktoren den Beginn und den Typ des Trockenen Auges beeinflussen, wobei eine strikte Zuordnung nicht immer möglich ist.

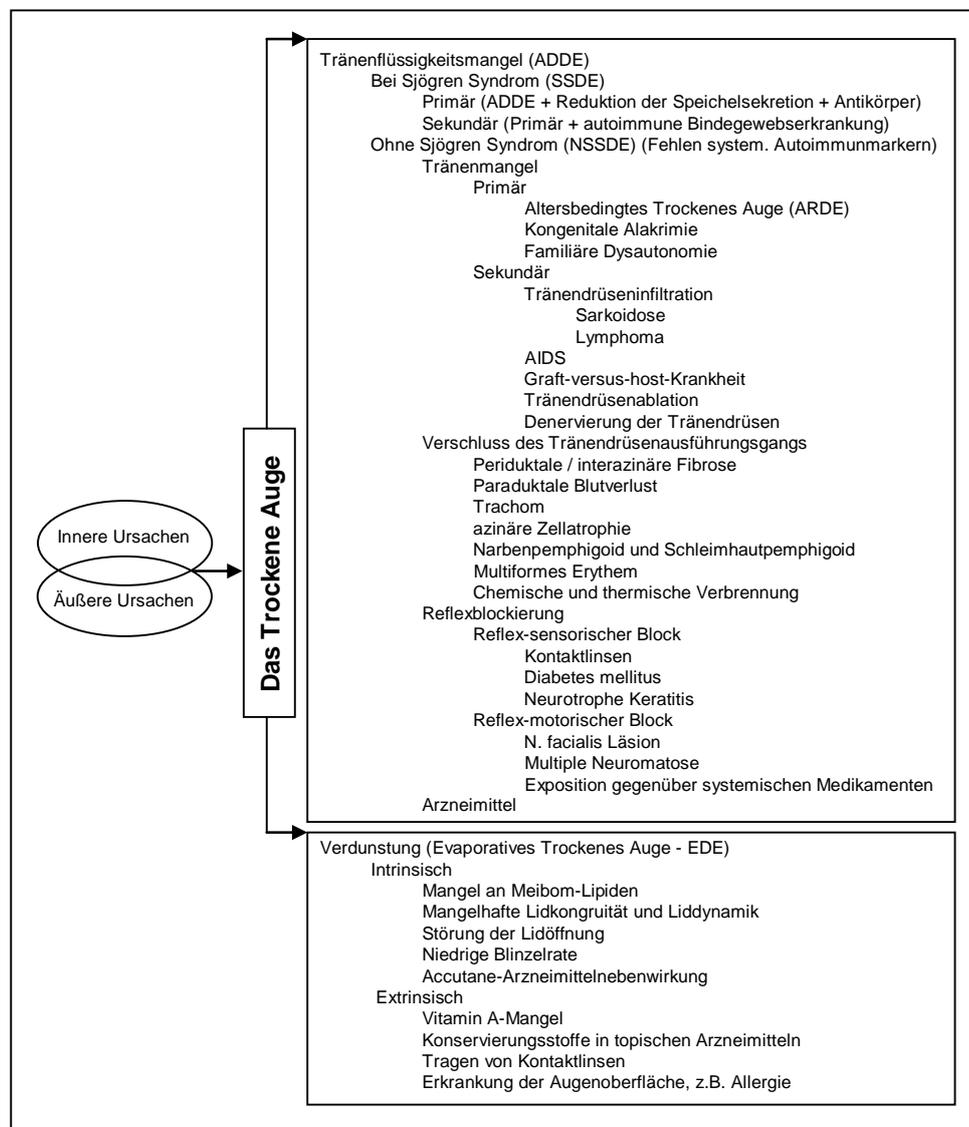


Abbildung 1: Die Ätiologie und Einteilung des Trockenen Auges.
 Modifiziert nach: DEWS - Report (2007) [14]

Zu den inneren Risikofaktoren zählt eine verringerte Blinkrate. Was das Lidschlagintervall erhöht und so die Verdunstungszeit zwischen den Lidschlägen verlängert [31]. Dies kann physiologisch (individuelle Besonderheit [32]), aber auch pathologisch (Brillenträger [33], Depression [23, 31], Morbus Parkinson [34]) bedingt auftreten.

Auch bei der Weite der Augenlidöffnung kommt es zu physio- und pathologischen Schwankungen. Mit der größten Lidöffnung beim Blick nach oben, wobei mit zunehmender Augenlidbreite der Verdunstungsverlust zunimmt [35], wie auch beim endokrinen Exophthalmus [36]. Ferner scheinen Sexualhormone in der Pathogenese des Trockenen Auges eine wichtige Rolle zu spielen [37]. Da für eine normale Funktion der Tränen- und Meibom - Drüsen erforderlich [38, 39], kann eine verringerte Androgenkonzentration [40] (im Alter [41], Antiandrogen - Therapie beim Prostatakarzinom [42], Androgen - Unempfindlichkeitssyndrom [43]), über die Reduktion von TGF - beta [20], ein Trockenes Auge begünstigen, jedoch durch topische oder systemische Androgentherapie verhindert werden [44]. Eine gesteigerte Östrogenkonzentration [42, 43, 45] (menopausale Östrogentherapie [14, 30], Ovarialinsuffizienz [45]) stellt ebenfalls ein Risiko für ein Trockenes Auge dar. Diverse physiologische Veränderungen im Alterungsprozess scheinen prädisponierend zu wirken. Es kommt zu einer Reduktion des Tränenflusses und -volumens [46], der Tränenfilmstabilität [47], der Becherzellichte [48] sowie einem Anstieg der Tränenosmolarität [46] und Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Meibom - Drüsen [41]. Bisher ist man sich uneinig, ob die Tränendynamik bei einer gesunden Population im Alter wirklich beeinflusst wird [49]. Im Alter nehmen jedoch Ductuspathologien zu, die über eine Verschlusswirkung Dysfunktionen des Drüsengewebes fördern [50]. Auch Autoimmun- und immunologische Systemerkrankungen (rheumatoide Arthritis [51], progressiv systemische Sklerodermie [52], systemischer Lupus erythematoses [53], Dermatomyositis [54]) können Drüsengewebe schädigen und ophthalmologische Beschwerden hervorrufen. Aktivierte T - Zellen infiltrieren und schädigen dabei duktile und azinäre Zellen und führen zu einer Hyposekretion der entsprechenden Drüse. In Oberflächenepithelzellen kommt es zur inflammatorischen Zytokinaktivierung, einer Expression von Autoantigenen (La, Ro, Anti - M3 - Antikörper und Fodrin [55, 56]) sowie zu einer Retention von gewebespezifischen CD 4 - und CD 8 - T - Zellen [57]. In mehreren Studien führten Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus [58, 59]) über mikrovaskuläre Veränderungen der Tränendrüse, einer sensorischen oder autonomen Neuropathie zu Trockenen Augen. Dermatologische Erkrankungen können zur Obstruktion und Atrophie der Meibom - Drüsen führen [60] und damit deren Dysfunktion auslösen [61]. Auch die Ernährung spielt ätiologisch eine Rolle.

So ein Mangel an essentiellen Omega - 3 - bzw. erhöhter Anteil an Omega - 6 - im Vergleich zu Omega - 3 - Fettsäuren [62], eine vegane Ernährung [63], Essstörungen und Malabsorption [64]) sowie bariatrisch chirurgische Eingriffe [65]. Da für die Expression der Glykokalix und die Entwicklung der Becherzellen in Schleimhäuten erforderlich [66], schädigt ein Mangel an Vitamin A [67] die Tränendrüsen. Es kommt zu einem Verlust an konjunktivalen Becherzellen und damit an Tränenfilmmuzinen [68]. Dies führt zur Tränenfilminstabilität und damit zu einem Mangel an Tränenflüssigkeit [69]. Somit findet Vitamin A Einsatz in der Therapie des Trockenen Auges [70]. Polychloriertes Biphenyl (PCB) ist verantwortlich für eine Vielzahl von Organschäden und verursacht eine Keratinisierung von Meibomdrüsenausführungsgängen bei Kaninchen [71] und Hamstern [72]. Ebenso kann auch eine Vielzahl an Arzneimitteln den Tränenfilm beeinflussen und ein TA begünstigen [14].

Zu den äußeren Risikofaktoren zählen eine erniedrigte relative Luftfeuchtigkeit oder eine erhöhte Luftgeschwindigkeit und Raumtemperatur sowie eine schlechte Luftqualität [73, 74]. Sie sind entweder natürlich geographisch gegeben oder künstlich geschaffen (Büroräume [75], Computerarbeit [76] (CVS [32]), Klimaanlage [77], Kosmetika [78], Flugreisen [79]) und erhöhen die Verdunstungsrate der Tränenflüssigkeit. Natürlich können alle Schädigungen des Regelkreislaufes der Tränensekretion zu Trockenen Augen führen. Eine parasymphatische Denervierung der Tränendrüse [80] (bei Affen [81] und Kaninchen [82]) reduziert die Blinkrate, den Tränenfluss sowie die Tränensekretion und aktiviert inflammatorische Prozesse. In diesem Zusammenhang sind auch refraktive Eingriffe am Auge (PRK, RK, LASIK [83 - 85]) als Risikofaktoren zu nennen. Die Prävalenz für ein Trockenes Auge nach LASIK liegt zwischen 0,25 [86] und 48 % [87] und einer Inzidenz von 33 % [88]. Bei Patienten mit Trockenen Augen können nach Operationen am Auge die Hornhautempfindlichkeit herabgesetzt und die Wundheilung sowie physiologisch trophische Faktoren beeinträchtigt sein, was postoperative Infektionen u.a. Komplikationen begünstigen kann [89]. Eine umfangreiche sensorische Denervierung tritt auch bei der neurotrophen Keratitis, im Rahmen einer Herpes simplex Keratitis oder eines Herpes zoster ophthalmicus, auf [90]. Dies führt zu einer verminderten Freisetzung von Substanz P und Expression von Nervenzwachstumsfaktoren [91, 92]. Und ebenso kann außer dem sensorischen, über eine Schädigung des N. facialis und seiner Derivate, auch der sekretomotorische Schenkel des lakrimalen Regelkreislaufes betroffen sein. Augenliddeformitäten als Folge von Lid- schwellung und Vernarbungsprozessen unterschiedlichster Ätiologie (chirurgische Eingriffe [93], Trachom [94], Pemphigoid [95], Erythema multiforme [96], thermisch oder chemische Verbrennungen [97]) beeinträchtigen die Lidapposition und -dynamik und beeinflussen so die Verteilung des Tränenfilms.

Zudem können Drüsenausführungsgänge verschlossen werden und Unregelmäßigkeiten der Hornhautoberfläche zu einem unphysiologischen Aufreißen des Tränenfilms führen [98]. Das Tragen von Kontaktlinsen kann ebenfalls eine Reduktion der Hornhautsensitivität, eine damit einhergehende Verminderung der Lidschlagfrequenz und Tränendrüsensekretion in Verbindung mit einer gesteigerten Tränenosmolarität [99, 100] begünstigen. Über Veränderungen am Oberflächenepithel ist die Literatur uneins. Die Becherzellichte nimmt je nach Studie ab [101], steigt an [102] oder bleibt gleich [103]. Ebenso gegensätzlich sind die Aussagen zu Entzündungs- und Muzinmarkern. Einige Autoren berichten von einem Anstieg der Entzündungsmarker (HLA - DR, ICAM - I) und einer Reduktion der Expression von Muzinmarkern (MUC 5AC) [104], was andere nicht belegen konnten [66]. 50 - 75 % der Kontaktlinsenträger berichten von einer Linsenunverträglichkeit [105] mit Symptomen eines Trockenen Auges [33], was bei 12 - 24 % [106] die Aufgabe des Tragens zur Folge hatte. Entzündungen des Drüsengewebes, wie bei der Sarkoidose [107], dem Lymphom [108], HIV - [109], Hepatitis C - [110] oder HTLV - 1 - Infektionen [111], können dieses schädigen und die Tränensekretion negativ beeinflussen. Im Rahmen der Krebsbehandlung wurde ein Trockenes Auge aufgrund einer Strahlentherapie [112], oder als häufige Komplikation (56 - 78 %) der GVHD ungefähr sechs Monate nach einer hämatopoetischen Stammzellentransplantation [113], insbesondere bei Kindern [114], beobachtet. Allergisch bedingte Trockene Augen worden bisher sehr gut untersucht [115]. Bei der allergischen Reaktion kommt es nach Antigenexposition zur IgE vermittelten Mastzellendegranulation mit einer Freisetzung von Entzündungszytokinen. Dem folgt zuerst im Bindehaut-, später im Hornhautepithel der Augenoberfläche eine Th2 - Antwort mit submukosalen Veränderungen und Störungen der Muzinproduktion [116] und letztendlich der Zelltod des Oberflächenepithels. Dadurch können eine Reihe von sekundären biologischen Kettenreaktionen ausgelöst werden. Diese Sekundärreaktionen führen zu einer Tränenfilmhyperosmolarität und schließlich zu einer Hyperosmolarität der Epithelzellen der Augenoberfläche und stimulieren unter Beteiligung von MAP - Kinasen und NFkB Signalwegen eine Vielzahl von Entzündungsereignissen [117]. Hierbei kommt es zur Freisetzung von Matrix - Metalloproteinasen (MMP - 9) und Entzündungszytokinen [118]. Diese induzieren eine erhöhte Expression von MHC - II Antigenen, die ihrerseits zu einer gesteigerten Aktivierung von Antigen - präsentierenden Zellen und so zu einem Anstieg aktivierter T - Zellen beitragen, welche dann wieder zu Tränendrüse und Bindehaut zurückkehren (Homing). Es kommt nach Entzündung und Infiltration des Drüsengewebes mit CD 4+ - T - Zellen und B - Zellen zu einer Ausbreitung der Entzündungsmediatoren über die Augenoberfläche durch die Tränenflüssigkeit [119].

Allerdings können die Entzündungsmediatoren auch direkt an der Augenoberfläche entstehen [120]. Es folgt die Apoptose von Oberflächenepithelzellen [121], sowie von Becherzellen [122] und so die Reduktion des sekretorischen Muzins MUC 5AC [123]. In der Anfangsphase eines Trockenen Auges postuliert man eine Trigemini - Reflexstimulation der Tränendrüse, um kompensatorisch mit einer gesteigerten Blinkrate, und vermehrter Tränensekretion einer Tränenhyperosmolarität entgegen zu wirken [124]. Diese übermäßige Reflexstimulation kann wiederum eine neurogen bedingte Entzündungsreaktion innerhalb des Drüsengewebes auslösen [22] und vermutlich eine Erschöpfung der Tränendrüse zur Folge haben [125]. In der darauf folgenden Phase der Chronifizierung sorgt der Langzeiteinfluss von Entzündungsmediatoren auf die Sinnesnervenenden für eine Verminderung der sensorischen Reflexaktivität der Tränensekretion mit morphologischen Veränderungen im subbasalen Nervenplexus [126]. Dabei nimmt die Augenoberflächensensibilität, sowie die Sekretionsreaktion der Tränendrüsen deutlich ab [127].

Subjektiv äußert sich dies in einem facetten- und kombinationsreichen Bild aus Brennen, Drücken, Ermüdbarkeit, Fremdkörpergefühl, Kratzen, Lichtscheu, Mißempfindungen, Sandkornggefühl, Sehstörungen, Tränen, Trockenheit und Überempfindlichkeit. Objektiv zeigen sich chronische Lidrandentzündungen, geschwollene Augenlider, Rötung und Schleimabsonderung. Betroffene schildern Sehbeschwerden, wie vernebeltes, verschwommenes Sehen und eine verminderte Kontrastempfindlichkeit und Sehschärfe [128, 129]. Es kommt zu Beeinträchtigungen der physischen und psychischen Gesundheit im täglichen, wie auch im Berufsleben, der Freizeit sowie bei sozialen Interaktionen, mit negativer Auswirkung auf Lebensqualität und allgemeinem Wohlbefinden [130, 131].

Aufgrund der ätiologischen Komplexität und der facettenreichen Ausprägung stellt die Behandlung des Trockenen Auges eine besondere Herausforderung dar. Prinzipiell sollte die Grundsätzlichkeit der Erkrankung erkannt und behandelt werden, da jedoch kausalthérapeutische Ansätze gegenwärtig noch recht unbefriedigend sind, muss eine symptomatische Behandlung erfolgen [20]. Trotz des häufigen Einsatzes von Tränenersatzmitteln herrscht ein Mangel an groß angelegten verblindeten klinischen Vergleichsstudien. Und so fehlt meist ein signifikanter Zusammenhang zwischen Behandlung und klinischen Ergebnissen [132]. Es werden zwar eine Vielzahl von Tränenersatzmitteln zugelassen und angewendet, deren klinische Wirksamkeit ist jedoch häufig nicht ganz verstanden und umstritten [14]. Dabei sind Tränenersatzmittel besser als physiologische Kochsalzlösung, da NaCl Muzine vom Epithel herunterspült und dadurch die Benetzung der Augenoberfläche verschlechtert [133].

Durch den Verschluss des Punctum lacrimale (durch Kollagen-, Histoacryl-Gewebekleber, chirurgische Maßnahmen oder Punctum Plugs), wird die Tränenflüssigkeit am Abfließen in den Tränen-Nasen-Gang gehindert, verbleibt somit länger auf der Augenoberfläche, mit positiv klinischem Erfolg [14, 134, 135]. So kann der topische Einsatz von Tränenersatzmitteln, Augensalben und -gelen, als auch der Verschluss der Puncta lacrimalia, die Kontrastempfindlichkeit, die Sehschärfe und die Regelmäßigkeit des Hornhautepithels verbessern [132, 136]. Allerdings werden die Symptome dadurch nur selten vollständig beseitigt [14].

Das Tragen einer feuchtigkeitserhaltenden Brille [137], einer feuchten Kammer (Uhrglasverband) sowie Spezialkontaktlinsen [138] finden ebenso in der Therapie Anwendung. Ein recht neuer Therapiepfad setzt auf Stimulantien der Tränen- und / oder der Muzin-Sekretion, mit so genannten Sekretagoga [139]. Wie dem P2Y2-Rezeptoragonist Diquafosol [140], die Muzin-Stimulantien Rebamipid [141], Gefarnat [142] und Ecabet [143] oder das MUC 1 Stimulans 15 (S) - HETE [144]. Zudem kommen cholinerge Agonisten wie Pilocarpin [145] und Cevilemin [146], aber auch biologische Flüssigkeiten, wie Speichel (Transplantation der Glandula submandibularis) [147] oder Serum [148] zum Einsatz. Letzteren fehlt es an Antigenität, sie sind frei von Konservierungsmitteln und reich an epitheliotropen Faktoren (Wachstumsfaktoren, Immunglobulinen). Des Weiteren besteht die Möglichkeit zur Behandlung der Entzündungsreaktionen an der Augenoberfläche mit antiinflammatorischen Therapeutika wie Cyclosporin A [122, 149], Pimecrolimus, Tacrolimus, Kortikosteroide [118, 150, 151] sowie Tetracycline [152]. Je nach morphologischer Ätiologie kann ebenso ein chirurgischer Eingriff als therapeutische Maßnahme nötig sein [20]. Ferner werden bei Bedarf physikalische (Augenbäder, Rotlicht) und psychosomatische Begleittherapien (autogenes Training [153], Akupunktur [154], Balneotherapie [155]) eingesetzt.

Die Therapie des meist chronisch verlaufenden Trockenen Auges erfordert von Arzt und Patient viel Geduld und regelmäßige Kontrolluntersuchungen mit patientengerechter Therapieoptimierung. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis des Trockenen Auges erzielt wurden, sind viele Aspekte zur Pathogenese noch unklar. 2007 konnten erstmalig alle bisher bekannten Surfactant-Proteine (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) sowohl an der Augenoberfläche, als auch im Tränenapparat nachgewiesen werden. Deren Funktionen sind vor allem für die Lunge sehr gut untersucht, für das Auge aber bislang nur vermutbar und könnten für die Physiologie der Augenoberfläche und die Pathogenese des Trockenen Auges eine bedeutende Rolle einnehmen. So hat diese Arbeit zum Ziel, tiefere Einblicke in das humane - okuläre - Surfactant - System im Rahmen des TA zu erhalten.

1.3 Die Surfactant - Proteine

Bereits seit 1929 ist das Surfactant - System Gegenstand wissenschaftlicher Betrachtungen und wurde erstmalig in der Lunge beschrieben [156, 157]. Dabei ist das Surfactant (surface active agent) ein komplexes oberflächenaktives Gemisch aus Lipiden (90 %), Proteinen (8 %) und Kohlenhydraten (2 %) [158]. Die darin enthaltenen Surfactant assoziierten Proteine (SP) werden nach Possmayer in SP - A, SP - B, SP - C und SP - D unterteilt [159]. Diese konnten neben der Lunge bisher in der Tuba auditiva [160], Nasenschleimhaut [161], Haut [162], Plazenta [163] sowie in Parotis und Glandula submandibularis [164] nachgewiesen werden. SP - D zudem in Hoden, Magen, Ovar, Ösophagus und Uterus [165 - 167]. 2007 erfolgte der Nachweis im humanen Gewebe der Augenoberfläche, des Tränenapparates (Tränendrüse, akzessorische Drüsen des Lids und ableitenden Tränenwege) und in Tränenflüssigkeit auf m - RNA- und Proteinebene [168, 169]. Die hydrophilen SP - A und SP - D, wie auch die hydrophoben SP - B und SP - C, werden in der Lunge im rauen endoplasmatischen Retikulum der Pneumozyten Typ 2, sowie in Clara - Zellen gebildet [157, 170], durch den Golgi - Apparat in multivesikulären Körperchen transportiert und als Lamellarkörperchen gespeichert [171] (Abbildung 2).

SP - A, mit einem Molekulargewicht von 28 - 36 kDa (Pro - Form: 66 kDa) [172], kommt in der Lunge hauptsächlich in Assoziation mit Phospholipiden vor und gehört zur Kollektin - Untergruppe der C - Typ Lektine [173]. Das Gen liegt auf Chromosom 10 q und kodiert für 248 Aminosäuren [174]. C - terminal befindet sich eine Kohlenhydrat - Erkennungs - Domäne [175], die mikrobiologische Bindungen ermöglicht und so mögliche Pathogene agglutiniert und / oder Immunzellen (dentritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen) zur Phagozytose präsentiert [176]. SP - A dient so der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr [170, 177]. Mit Ähnlichkeit zum Komplementfaktor c 1 q opsoniert SP - A Makrophagen und bakterielle Bestandteile [178], verstärkt die Chemotaxis [164, 177] und stimuliert die Freisetzung von Sauerstoffradikalen [174]. SP - A defiziente Mäuse zeigen eine abgeschwächte Immunabwehr [179]. Des Weiteren interagiert SP - A mit Lipiden [180], reguliert deren Ein- und Ausbau an der Gas - Flüssigkeits - Interphase der alveolaren Monolayer [181], sowie deren Aufnahme und Abgabe in Pneumozyten Typ 2 [174]. SP - A reguliert und stabilisiert das Lungensurfactant, dient der Ausbildung von tubulärem Myelin (Speicherform des Surfactant) und unterstützt die SP - B induzierte Verringerung der Oberflächenspannung in den Lungenalveolen.

Interessanterweise führt eine Deletion des SP - A - Gens in Mäusen nicht zu Veränderungen der Atemfunktion, Lungencompliance oder des Surfactantmetabolismus [182], solange kein Pathogen oder Stimulus einwirkt. Auf diesen folgt eine massive Lungenentzündung, die sich nach Gabe von SP - A bessert [179].

SP - D, ebenfalls ein Vertreter der Kollektin - Familie des C - Typs, mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, wird vom Epithel der Pneumozyten Typ 2, verschiedenen Zellen des Atemtrakts und mukösen Zellen des Magens synthetisiert. Es hat, wie auch SP - A, Ähnlichkeit zum Mannose bindenden Lektin [173, 183] und das für 355 Aminosäuren kodierende Gen liegt auf Chromosom 10 q. Beim Menschen ist SP - D in weniger als 10 % mit Phospholipiden assoziiert [174]. Auch SP - D ist funktionell ein Protein der Immunabwehr. Es bindet und aktiviert Makrophagen, induziert die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmetaboliten [174] und bindet, wie SP - A, über Kohlenhydrat - Erkennungs - Domänen an Lipopolysaccharid - Oberflächen, als Voraussetzung zur Agglutination [174, 184] und Interaktion mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. Bei SP - D defizienten Mäusen konnte dessen Wichtigkeit in der Lipid- und Surfactant - Homöostase der Lunge gezeigt werden [185]. So fällt gleich nach Geburt, aufgrund progressiver Lipidakkumulation in den Atemwegen, ein veränderter Phänotyp auf, mit alveolären Lipidosen und Aktivierung von Makrophagen sowie Metalloproteinasen. Es kommt zu emphysematischen Veränderung mit subpleuralen Fibrosen und chronischen Entzündungen [186].

1979 erfolgte die Erstbeschreibung von SP - B und SP - C in organischen Extrakten aus extrazellulärem Surfactant und Lamellarkörperchen. Deren Charakterisierung und Aufreinigung gestaltet sich durch ihre hohe Hydrophobizität und das kleine Molekulargewicht schwierig [187].

SP - B hat unter nicht reduzierten Bedingungen ein Molekulargewicht von 15 - 18 kDa [188] und 7 [189] bzw. 8,7 kDa [190] bei reduzierten (Pro - Form: 40 kDa). Das ca. 9500 Basen lange Gen ist auf Chromosom 2 p lokalisiert und kodiert für 79 Aminosäuren [171]. Funktionell sind dabei zahlreiche Cysteine wichtig. Sie bilden stabilisierende Disulfidbrücken - Oligomere [189] und ermöglichen dem zu 90 % als Dimer und 10 % als Monomer vorkommenden SP - B während der Expiration [191] die Reduktion der Oberflächenspannung in der Lunge [192]. SP - B reguliert den Lipid - Umsatz an der Gas - Flüssigkeits - Interphase der Lungenoberfläche. Es unterstützt bei Inspiration den Ein-, bei Expiration den Ausbau von Lipiden [181] und fördert die Wiederaufnahme von Surfactant in Pneumozyten Typ 2, die Ausbildung tubulären Myelins, die Formation von Lamellarkörperchen, sowie die Verbindung und Fusion von Membranen [181, 192 - 194]. Zudem vermindert SP - B das Wachstum von Bakterien [195] und schützt die Serumproteine des Surfactantfilms vor deren Inaktivierung [196].

Eine Deletion in Kaninchen hat eine ernsthafte Schädigung der alveolären Oberfläche und respiratorischen Stress zur Folge [197].

SP - C ist mit einem Molekulargewicht von 4 - 6 kDa (Pro - Form: 6 - 12, 14, 16, 21 und 26 kDa) [159] das bisher kleinste und hydrophobste Surfactant - Protein, das primär aus 191 und nach posttranslationaler Modifizierung (wie Glykosylierung, Acylierung, Veresterung mit Fettsäuren [171] aus 33 - 35 Aminosäuren besteht. Es ist auf Chromosom 8 p kodiert und besitzt in seiner alpha - Helix - Form viele Valin - Seitenketten [174]. SP - C dient in der Lunge der Aufnahme von SP - A in, und der Verbindung von Reservoir - Bilayer - Strukturen mit dem Lipid - Monolayer an der Alveolenoberfläche und einer beschleunigten Aufnahme und Ordnung von Phospholipiden in der Lipidschicht [198]. Auch SP - C sorgt während der Inspiration für den Ein-, und während der Expiration für den Ausbau von Lipiden an der Gas - Flüssigkeits - Interphase der Lunge [180, 181] sowie dem Schutz vor Inaktivierung von Serum - Proteinen im Surfactant - Film [199]. So dienen SP - B und SP - C der Ausbildung und Stabilisierung oberflächenaktiver Membranen und sind daher u.a. beim ARDS pathophysiologisch bedeutsam [200].

Überträgt man die bisher entschlüsselten Eigenschaften der Surfactant - Proteine auf die Gewebe der Augenoberfläche und des Tränensystems, kommen diesen im Hinblick auf die Funktionalität und Stabilität des Tränenfilms eine immense Bedeutung für die Immunabwehr und Oberflächenspannung zu und könnten in der Physiologie des Auges und der Pathogenese des Trockenen Auges eine wichtige Rolle spielen.

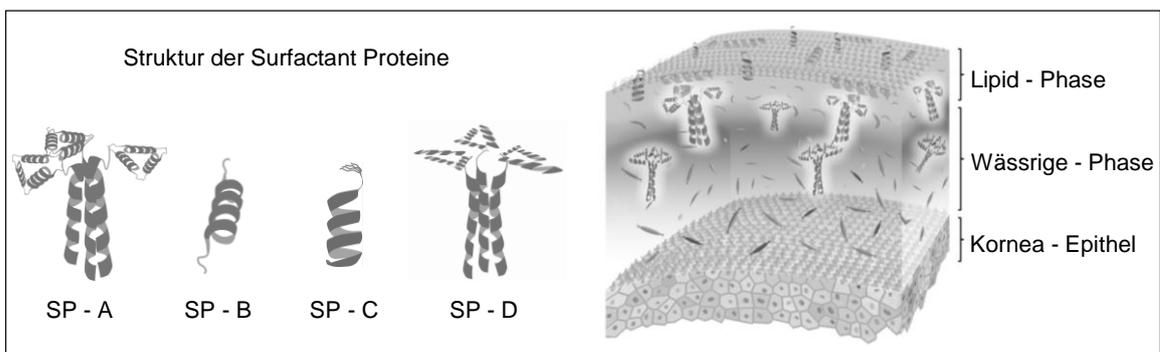


Abbildung 2: Struktur der Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D und deren Lokalisation im Tränenfilm entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften.
Modifiziert nach: Bräuer L. et al. (2008) [201]

2 Material und Methoden

2.1 Eingesetzte Materialien und Chemikalien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg (D)
Falcon-Röhrchen	P & W Medizintechnik GmbH, Berlin (D)
Gelblotting-Filterpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel (D)
Gelkassette	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Gelkassetten-Kämme	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Hohlnadel-Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Tuttlingen (D)
Hybond-ECL	Amersham Biosciences, New York (USA)
Hyperfilm-ECL	Amersham Biosciences, New York (USA)
Kunststoffkapillaren	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth (D)
Mehrkanalpipette	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg (D)
Nitrocellulose-Membran	Amersham Biosciences, New York (USA)
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Quarzküvetten	Novodirekt GmbH, Kehl (D)
Röntgenkassette	Rego X-ray GmbH, Augsburg (D)
Schirmer-Test-Streifen	Bausch & Lomb, Berlin (D)

2.1.2 Geräte

Elektrophorese-Gerät	Hofer SemiPhor, San Francisco (USA)
Elektrophorese-Kammer	OWI Separation Systems, Porthmouth (NL)
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg (D)
Kühlzentrifuge-Biofuge	Heraeus Instruments, Gera (D)
Magnetrührer	MLW Rührgerätewerk Medingen, Freital (D)
pH-Meter-Digital	Wiss.-Tech. Werkstätten GmbH, Weilheim (D)
Präzisionswaage	G.Kern & Sohn, Albstadt (D)
Schüttelgerät-Thys 2	MLW Labortechnik, Ilmenau (D)
Spektrophotometer	Amersham Biosciences, New York (USA)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Wasserbad-Thermostad	Haake, Karlsruhe (D)
Western-Blot-Apparatur	Hofer SemiPhor, San Francisco (USA)

2.1.3 Chemikalien

Acetonitril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Acrylamid-Solution	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Ammoniumpersulfat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Bovines-Serum-Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D)
Coomassie-Blue-G-250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethanol 99,8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethylendiamintetraacetat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natriumbicarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natriumhydrogencarbonat	VEB Laborchemie, Apolda (D)
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ponceau-S	Serva Feinbiochemie, Heidelberg (D)
Salzsäure 37 %	VEB Laborchemie, Apolda (D)
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Sucofin-Milchpulver	TSI, Zeven (D)
TEMED	BIO-RAD Laboratories GmbH, München (D)
Trifluoressigsäure	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Tween 20	Serva Feinbiochemie, Heidelberg (D)

2.1.4 Molekulargewichtstandard

Page-Ruler-Protein-Ladder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (D)

2.1.5 Gebrauchslösungen

Destaining Solution 1	300 ml Methanol, 100 ml Essigsäure 10 %, Reinstwasser ad 1 l
Destaining Solution 2	36,3 g Tris Base, 8 ml 10 % SDS, Reinstwasser ad 1 l (pH 8,8)
Destaining Solution 3	6 g Tris Base, 4 ml 10 % SDS, Reinstwasser ad 1 l (pH 6,8)
Fixierlösung	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Foto-Entwicklerlösung	30 g Natriumbicarbonat, 4 mg Natriumthiosulfat, 500 µl Formaldehyd, Reinstwasser ad 1 l
Foto-Fixierlösung	240 g Natriumthiosulfat, 10 g Natriumsulfit, 25 g Natriumbisulfit, Reinstwasser ad 1 l
HRP Millipore	1 ml HRP Substrat Peroxide Solution, 1 ml HRP Substrat Luminol Reagent
Laemmli Buffer 1 x	100 ml Laemmli 10 x, Reinstwasser ad 1 l
Laemmli Buffer 10 x	30,0 g Tris Base, 144 g Glycin, 10 g SDS, Reinstwasser ad 1 l
Milchpulverlösung 5 %	2,5 g Milchpulver, 2,5 g BSA, 50 ml TBST
Reducing Sample Buffer	2 ml Glycin, 4 ml 10 % SDS, 2,5 ml Solution 3, 1 ml Mercaptoethanol, Reinstwasser ad 20 ml
Ripa Buffer	790 mg Tris Base, 900 mg NaCl, 10 ml NP 40 10 %, 2,5 ml Na-desoxycholate 10 %, 1 ml EDTA 100 mM, Reinstwasser ad 100 ml
Stripping Buffer	10 ml 20 % SDS oder 20 ml 10 % SDS, 12,5 ml 1 M Tris-HCl, 700 µl Mercaptoethanol, Reinstwasser ad 100 ml (pH 6,8)
TBS/TBST 1 x	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, Reinstwasser ad 1 l (pH 7,4) TBST: 1 ml Tween zugeben
TBS 10 x	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris, Reinstwasser ad 1 l (pH 7,4)
Transfer Buffer 1 x	80 ml 12,5 x Transfer Buffer, 200 ml Methanol, 2 ml 10 % SDS, Reinstwasser ad 1 l
Transfer Buffer 12,5 x	18,2 g Tris Base, 90 g Glycin, Reinstwasser ad 1 l

2.1.6 SDS - Gele

Sammelgel 5 %	0,5 ml Acrylamid 40 %, 50 µl SDS 10 %, 7,5 µl TEMED, 0,5 ml 2 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl APS (60 mg / ml), 2,89 ml Reinstwasser
Trenngel 12 %	3 ml Acrylamid 40 %, 100 µl SDS 10 %, 15 µl TEMED, 1,9 ml 2 M Tris-HCl pH 8,8, 100µl APS (60 mg / ml), 4,9 ml Reinstwasser
Trenngel 18 %	4,5 ml Acrylamid 40 %, 100 µl SDS 10 %, 15 µl TEMED, 1,9 ml 2 M Tris-HCl pH 8,8, 100 µl APS (60 mg / ml) 3,4 ml Reinstwasser

2.1.7 Kits und Enzyme

ELISA Kit SP-A	Abnova GmbH, Heidelberg (D)
ELISA Kit SP-B	Abnova GmbH, Heidelberg (D)
ELISA Kit SP-C	Abnova GmbH, Heidelberg (D)
ELISA Kit SP-D	Abnova GmbH, Heidelberg (D)
Primär Antikörper SP-A	Chemicon International, Hofheim (D) 1 : 500 in 5 % Milchpulver-Lösung
Primär Antikörper SP-B	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen (D) 1 : 250 in 5 % Milchpulver-Lösung
Primär Antikörper SP-C	Chemicon International, Hofheim (D) 1 : 500 in 5 % Milchpulver-Lösung
Primär Antikörper SP-D	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen (D) 1 : 500 in 5 % Milchpulver-Lösung
Protein Assay Kit	BIO-RAD Laboratories GmbH, München (D)
Sekundär AK Anti-Mouse	Jackson Immuno Research, Suffolk (UK) in 5 % Milchpulver-Lösung 1 : 10000 für SP-A, -D, 1 : 15000 für SP-B
Sekundär AK Anti-Rabbit	DAKO Cytomation, Glostrup (DK) in 5 % Milchpulver-Lösung 1 : 15000 für SP-C

2.1.8 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitzesensible Lösungen werden über Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße steril gefiltert, hitzestabile Gebrauchswaren für 30 Minuten bei 1 bar und 120 °C autoklaviert.

2.2 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

2.2.1 Allgemeines Vorgehen

Um den 2007 erbrachten Nachweis der Surfactant - Proteine (SP - A, - B, - C und - D) im okulären Milieu nachzuvollziehen, erfolgen eigene molekularbiologische Untersuchungen mittels Western - Blot an Tränendrüse, Tränenflüssigkeit und Lunge. Diese Gewebeproben stammen von Körperspendern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg (MLU), wurden innerhalb von 4 - 12 Stunden nach dem Tod entnommen und bei - 80 °C gelagert. Die Gewinnung und Untersuchung von Tränenflüssigkeit lebender Probanden erfolgt mit Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der MLU (Aktenzeichen: 08 / 1977 Bu), nach einem Aufklärungsgespräch und freiwilliger Zustimmung der Probanden verbal und per Unterschrift. Zur Identifizierung der optimalen Entnahmetechnik von Tränenflüssigkeit sowie für Untersuchungen von Proteingehalt und -konzentration in Tränen erfolgen vergleichende Betrachtungen zwischen Kapillare und Schirmer - Streifen an eigener Tränenflüssigkeit mittels Anfärbung (Coomassie - Blue - G - 250, Silbernitrat, Ponceau - S - Rot), Gesamtproteinbestimmung nach Bradford und Western - Blot - Analysen von SP - A, - B, - C und - D. Um die Rolle von Proteinen, hier der Surfactant - Proteine, im Rahmen der Pathogenese des Trockenen Auges zu untersuchen, erfolgt in Kooperation mit den niedergelassenen Augenärzten Dipl. - Med. R. Sander (Halle a. d. Saale) und Dr. med. R. Dietz (Volkach a. Main) mittels Schirmer - Streifen (nach Schirmer I) eigenständig die nicht invasive Tränenentnahme bei 306 Probanden aus beiden Augen. Darunter 174 Frauen und 132 Männer im Alter von 18 bis 87 Jahren. Ein Trockenes Auge wurde durch den Augenarzt in 170 Fällen diagnostiziert. Es wurde ein Fragebogen erstellt (Abbildung 3), um neben der Probengewinnung auch anonymisierte Probandendaten zu erhalten. Die aufgenommenen Reflextränen werden in 200 µl Tris - HCl - Puffer bei - 25 °C gelagert und nach Bradford auf Gesamtprotein, sowie durch Enzym - Linked - Immuno - Sorbent - Assay ´s (ELISA´s) auf alle vier Surfactant - Proteine hin untersucht. Die anamnestisch erhobenen Daten werden katalogisiert und einer statistischen Auswertung mittels SPSS - Software unterzogen.

2.2.2 Probandenfragebogen

Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg		Institut für Anatomie und Zellbiologie	
Fragebogen zur Erfassung anamnestischer Daten bei Sicca - Patienten			
Alter			
Geschlecht (M / W)			
	ja	nein	Medikation / Anmerkung / Sonstiges
Objektive Symptome am Auge			
Rötung			
Schwellung			
Subjektive Symptome am Auge			
Trockenheitsgefühl			
Fremdkörper- / Sandkorngefühl			
Jucken			
Brennen / Schmerzen			
Druckgefühl			
Schnelle Ermüdbarkeit			
Tränenfluss bei Wind / Lichtwechsel			
Schwierigkeiten beim Lidschluss			
Neigung zur Entzündung			
Überempfindlichkeit gegenüber			
Luftzug: Klimaanlage, Wind			
Umwelteinflüsse: Sonne, Rauch, Kälte			
Benutzung von Kosmetika			
Benutzung von Kontaktlinsen			
Rauchen			
Arbeitsplatzbelastung			
Klimaanlage, Luftzug			
Bildschirmarbeit			
Staub / Gas			
Lösungsmittel / Chemikalien			
Allergie			
Pflanzen			
Tiere			
Chemikalien			
Ophthalmologische Befunde			
Operation / Laservorbehandlung			
Verletzung / Irritation			
Medikamentöse Behandlung			
Dermatologische Befunde			
Trockene Haut			
Neurodermitis			
Psoriasis			
Allgemeinanamnese			
Diabetes mellitus			
Fettstoffwechselstörung			
Herz-Kreislauf-Erkrankung			
Hypertonie			
Gastro-Intestinale-Erkrankung			
Lebererkrankung			
Lungenerkrankung			
Nierenerkrankung			
Schilddrüsenerkrankung			
Rheumatische Erkrankung			
Neurologische Erkrankung			

Abbildung 3: Fragebogen zur Erfassung anamnestischer Daten beim Trockenen Auge
 Modifiziert nach: Anamnesebogen der Arbeitsgruppe des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands (BVA)

2.2.3 Proteinisolierung aus Gewebeproben

Für den Gewebeaufschluss werden die Proben mittels Pistill und Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinem Pulver zermahlen, das bis zur 200 µl Markierung in ein 2 ml Eppendorf - Tube gegeben wird. Nach Zugabe von 300 µl Ripa - Puffer erfolgt der Aufschluß im Rotor - Stator - Homogenisator sowie die Homogenisierung im Lyse - Puffer. Es folgt die Zugabe von Proteasen- (2 µl / 1 ml) und Phosphataseninhibitor (1 ml / 100 ml) und die Inkubation auf Eis für 30 Minuten, mit anschließendem Zentrifugieren bei 13000 rpm für 30 Min. bei 4 °C. Der Proteinüberstand wird in ein 1,5 ml Eppendorf - Tube gegeben und nach quantitativer Messung der Gesamtprotein-konzentration nach Bradford bei - 80 °C gelagert.

2.2.4 Entnahme von Tränenflüssigkeit am lebenden Probanden mittels Schirmer - Streifen und Kapillare

Zum Erhalt von Tränen für molekularbiologische Untersuchungen ist das Aufsaugen aus dem Bindehautsack mittels Kapillare etabliert. Dies birgt jedoch die Gefahr der Irritation bzw. Verletzung, die im schlimmsten Fall bis zur Erblindung führen kann. Um mögliche Risiken zu reduzieren, wurde der bereits in der Diagnostik des Trockenen Auges eingesetzte Schirmer - Streifen (Schirmer - Test) als mögliche Alternative zur Erforschung von Proteingehalt und -konzentration in Tränen untersucht. Er wird zurzeit für molekularbiologische Analysen eher als nicht geeignet angesehen. Im Folgenden werden beide Techniken näher vorgestellt.

Der Schirmer - Streifen geht auf den dt. Ophthalmologen Otto Schirmer (1864 - 1918) zurück. Nach Einhängen eines genormten Filterpapierstreifens in den Bindehautsack liegt er der Konjunktiva direkt an, wodurch Tränenflüssigkeit aufgesogen wird. Schirmer zeigte bei 100 Probanden im so genannten Schirmer - Test, dass im Durchschnitt nach 5 Min. der Streifen gerade ganz befeuchtet wurde. Werte unter 15 mm / 5 Min. werden dabei von einigen [9, 202], jedoch nicht allen [134] Autoren als pathologisch gewertet. Einige Autoren geben keine physiologische Minimalmenge an, da auch bei völlig negativem Schirmer - Test scheinbar keine Beschwerden auftraten [203]. Es zeigten sich zwischen gesunden Probanden und sogar im Vergleich der Augen eines Probanden erhebliche Differenzen zwischen 6,6 - 63 mm Laufstrecke im Schirmer - Streifen [6, 8, 203]. Außer probandenbezogenen Ursachen konnten Eisner et al. 1960 technische Ungenauigkeiten nachweisen, so dass sie dem Schirmer - Streifen lediglich eine „gute Orientierung“ zuschrieben [204]. Bereits 1933 konnten Lipschütz et al. feststellen, dass

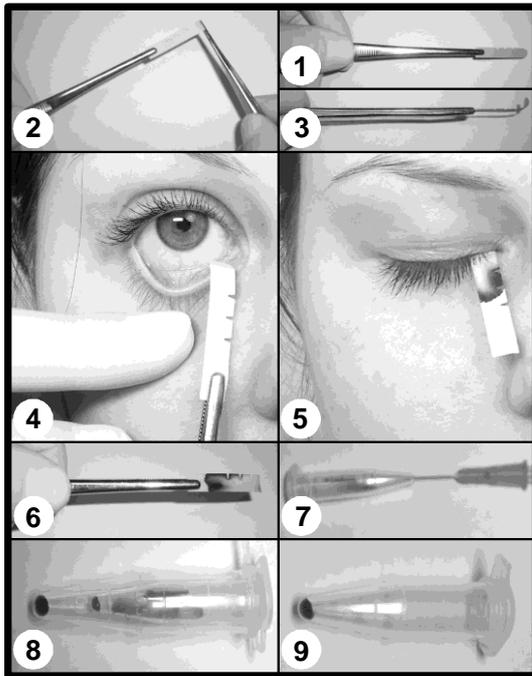


Abbildung 4: Entnahme und Aufbereitung von Schirmer - Tränen.

bei gefärbten Tränen unter der Spaltlampe der Tränenstrom entlang der Oberlidkante bei der Messung mit dem Schirmer - Streifen nicht erfasst wird und so Ergebnisse zu niedrig ausfielen [205]. Man unterscheidet den Schirmer - Test I und II, wobei die Rahmenbedingungen oft modifiziert wurden bzw. noch werden [9, 134, 202]. In der vorliegenden Arbeit werden industriell genormte Siccarta Test - Streifen nach der Schirmer - I - Methode verwendet (Abbildung 4). Ein Fließpapier wird von der abgerundeten Seite her nach ca. 5 mm rechtwinklig abgeknickt (1 - 3). Dieses Ende wird nach Herunterziehen des Unterlides in den unteren nicht anästhesierten Konjunktivalsack

direkt über das Punctum lacrimale in den medialen Augenwinkel mit einer Pinzette eingehängt (4), da Fett und Schweiß der Finger des Benutzers die Saugkraft des Papiers wesentlich vermindern [204]. Der Proband richtet den Blick nach oben, damit der Augapfel nach kranial rotiert. Die Augen werden während der Probenentnahme in Neutralstellung geschlossen. Der Rest des Streifens hängt frei, ca. 90° zur Augenoberfläche nach unten (5). In dieser Arbeit wird als Modifikation zum Schirmer - I - Test nach 5 Min. lediglich die Laufstrecke der Tränen im Streifen gemessen, der Streifen jedoch bis zur vollständigen Benetzung, maximal jedoch 15 Min., im Konjunktivalsack belassen, um möglichst viel Tränenflüssigkeit abzuernsten. Die Entnahme erfolgt mittels Pinzette nach Augenöffnung, indem das Unterlid herabgezogen und der Streifen nach oben entfernt wird (6). Zur Extraktion der Tränen folgt die Eingabe des Streifens in ein 0,6 ml Eppendorf - Tube, das an der Unterseite mittig mit einer Hohl-nadel - Kanüle punktiert wird (7). Dieses Tube wird darauf in ein 2 ml Eppendorf - Tube gestellt (8) und bei maximaler Umdrehung für 5 Min. zentrifugiert, wodurch die Tränenflüssigkeit aus dem Streifen heraus in das größere Tube abzentrifugiert wird (9).

Die Kapillare ist ein 7,5 cm langer und 0,2 cm dicker Hohlzylinder aus Plastik. Zur Entnahme von Tränenflüssigkeit wird das Unterlid, bei nach oben gerichtetem Blick, caudalwärts gezogen (Abbildung 5).

Die Kapillare wird waagrecht, leicht seitlich an den zum Vorschein kommenden Konjunktivalsack gehalten (1). Durch die auf der Oberfläche der Innenseite des Hohlzylinders wirkenden Adhäsionskräfte wird Tränen-

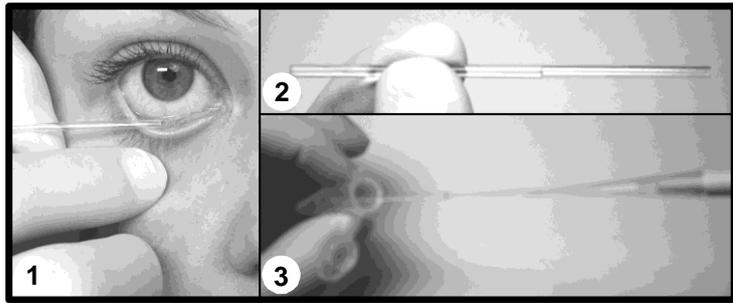


Abbildung 5: Entnahme und Aufbereitung von Kapillar-Tränen.

flüssigkeit in die Kapillare gesaugt (Kapillaraszension (2)). Zur Rückführung positioniert man ein Ende der Kapillare in ein Eppendorf - Tube. In das andere Ende steckt man eine 200 µl Eppendorf - Pipette und pipettiert die Flüssigkeit aus der Kapillare heraus in das Auffangtube (3).

2.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Dieses photometrische Verfahren wurde nach dem amerikanischen Biochemiker Marion M. Bradford (1976) benannt und beruht auf einer Stabilisierung des Triphenylmethan - Farbstoffes Coomassie - Brilliant - Blue - G - 250 durch ionische Wechselwirkungen mit kationischen Aminogruppen von Proteinen im sauren Milieu. Als Maß der Proteinkonzentration in Lösungen verschiebt sich dabei das Absorptionsmaximum des einst ungebundenen, grünen Farbstoffs von 465 auf 595 nm und führt zu einer Blaufärbung. Die Messung erfolgt mittels einem Protein - Assay - Kit aus Ethanol, Farb-

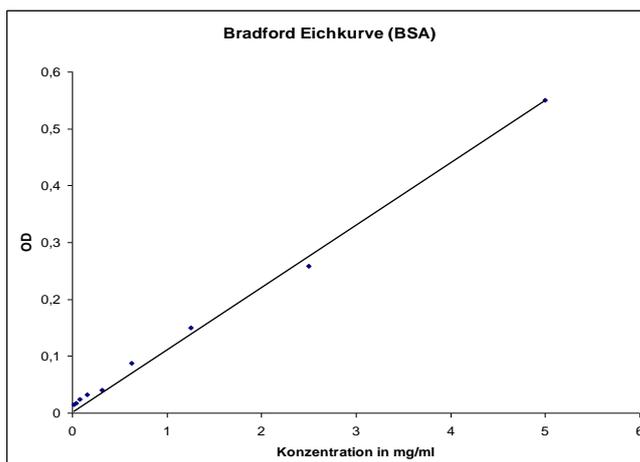


Abbildung 6: Bradford - Eichkurve (BSA) zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.

stoff und Phosphorsäure. Dem Kit beigelegt ist ein Rinder - Serum - Albumin - Standard (BSA) zur Erstellung einer Eichkurve, an der man den Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zu µg Gesamtprotein ermittelt. In eine Einmal - Küvette erfolgt die Eingabe von 800 µl destilliertem Wasser, 200 µl Bradford - Reagenz sowie 1 µl der zu messenden Proteinlösung. In einem Spektrophotometer erfolgt die Mes-

sung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm, indem breitbandiges Licht das Probengemisch in der Küvette durchstrahlt. Hindurch tretende Lichtquanten werden dabei je nach Proteingehalt unterschiedlich absorbiert.

Mittels Umrechnungsfaktor (0,054) wird aus der angegebenen optischen Dichte der Gesamtproteingehalt in $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ errechnet, wobei ein Gemisch aus 800 μl destilliertem Wasser und 200 μl Bradford - Reagenz als Leerwert dient (Abbildung 6).

2.4 SDS - Gelelektrophorese

Bei der SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. SDS (Sodium - Dodecyl - Sulfat) ist ein anionisches Detergenz aus einer aliphatischen Kette von 12 C - Atomen mit einer hydrophilen Sulfatgruppe. Diese lagert sich an Aminosäureketten von Proteinen an und bildet so einen Komplex, dessen Oberfläche nach außen gerichtete, negative Sulfatgruppen trägt. Dadurch wird die Proteineigenladung im Vergleich zur negativen Gesamtladung des SDS - Protein - Komplexes vernachlässigbar. Durch ein konstantes Masse - Ladungs - Verhältnis sind so alle Proteine vergleichbar und deren Bewegung im Gel proportional zum Molekulargewicht. Dieses als Molekularsieb wirkende Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, deren Zusammensetzung der zu erwartenden Proteingröße angepasst werden muss. Für die kleinen lipophilen Surfactant - Proteine SP - B und - C wurden ein 5 % Sammel-, sowie ein 18 % Trenngel verwendet, für die höhermolekularen hydrophilen SP - A und - D ein 5 % Sammel-, sowie ein 12 % Trenngel.

Zuerst wird das Trenngel in eine Vertikalgelkammer gegossen und für einen ebenen Abschluss mit gesättigtem Butanol überschichtet, das nach vollständiger Gelpolymerisation wieder entfernt wird. Anschließend erfolgt die Zugabe des Sammelgels, in das zur Formung von Probenfächerchen ein Kamm eingesetzt wird. Nach dessen Polymerisation wird die Gelkammer in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit 1 x Laemmli - Puffer geflutet wird. Nun erfolgt die Kammentfernung und die Taschen werden mittels Pipette mit Puffer gespült. 30 μg des aufzutrennenden Proteingemisches wird zusammen mit 15 μl RSB - Mercaptoethanol - Puffer für 10 Min. bei 100°C denaturiert, kurz gevortext und bei 9000 rpm anzenrifugiert, bevor die Eingabe in die Taschen erfolgt. Eine Tasche bleibt 5 μl eines Molekulargewichtstandards vorbehalten. Leere Taschen werden mit 10 μl RSB - Mercaptoethanol - Puffer besetzt. Die elektrophoretische Auftrennung des Probengemisches nach Größe, Ladung und anderen Eigenschaften in Proteinbanden folgt für 90 Min. durch Anlage eines zum Gel parallel gerichteten elektrischen Feldes. Im Sammelgel bei 80V, im Trenngel bei 120V.

2.5 Western - Blot

Nach der Elektrophorese werden die Proteinbanden mittels „Sandwich - Verfahren“ vom Trenngel auf eine Nitrozellulose - Membran transferiert. Benötigte Materialien, wie Filterpapier, Membran und Schwämme werden für 15 Min. in 1 x Transfer - Puffer äquilibriert. Das Gel wird aus seiner Kammer befreit, Sammelgel und überschüssiges Trenngel abgetrennt und luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Alle Bestandteile des Sandwichs werden auf Gelgröße zugeschnitten und wie folgt unter Druck in der Western - Blot - Apparatur aufgeschichtet: Anode, zwei Schwämme, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, zwei Schwämme, Kathode. Durch ein zum Gel senkrecht angelegtes elektrisches Feld (25 V, 125 mA) erfolgt für 90 Min. der Semidry - Proteinblot auf die Membran. Aufgrund hydrophober Wechselwirkung bleiben Proteine an der Membranoberfläche haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Darstellung der Proteinbanden im Gel erfolgt mittels dreißigminütiger Anfärbung durch Coomassie - Blau bzw. Silbernitrat. Der Nachweis des Transfers auf die Membran erfolgt mittels unspezifischer Proteinfärbung für 5 Min. durch Ponceau - S - Rot - Farblösung.

Für die folgende Antikörperreaktion müssen unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran mittels einstündiger Inkubation in 5 % Milchpulverlösung blockiert werden. Dann wird die Membran mit einem Gemisch aus Primär - Antikörper und 5 % Milchpulverlösung bei 4 °C über Nacht in einem verschlossenen 50 ml Zentrifugenröhrchen auf einem Kiproller inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, erfolgt die Waschung der Membran dreimalig mit TBST und einmal mit TBS für je 15 Min.. Dem folgt bei Raumtemperatur eine zweistündige Inkubation der Membran mit einem Gemisch aus Sekundär - Antikörper und 5 % Milchpulverlösung mit anschließender Waschung. Dreimalig mit TBST und einmal mit TBS für je 15 Min., um störenden Hintergrund zu beseitigen. Abschließend erfolgt die Visualisierung der Proteine mittels Enhanced - Chemoluminescence - Methode (ECL). Die Membran wird lichtgeschützt für 5 Min. mit einer Lösung aus 1 ml ECL - 1 (HRP - Peroxide - Solution) und 1 ml ECL - 2 (HRP - Luminol - Reagent) inkubiert. Unter alkalischen Bedingungen und im Beisein von Wasserstoffperoxid oxidiert die am Sekundär - Antikörper befindliche Meerrettich - Peroxidase das zyklische Diacylhydrazid Luminol. Luminol wird so vorübergehend in einen angeregten Zustand versetzt, was mit der Emission von Lichtquanten quittiert wird. In der Dunkelkammer führt dies zur Schwärzung des Röntgenbildes und somit zur Lokalisation und zum Nachweis von Proteinen. Die Belichtungszeit variiert dabei stark zwischen Sekunden und Stunden, je nach Proteinmenge und / oder Qualität der Antikörperreaktion.

2.6 Färbungen

2.6.1 Coomassie - Brillant - Blue G - 250

Dieser, ursprünglich aus der Textilindustrie stammende und 1896 nach der afrikanischen Stadt Kumasi benannte, Triphenylmethanfarbstoff dient der unspezifischen Anfärbung von Proteinen, indem er sich im sauren Milieu an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Die Coomassie - Färbung ist eine der gebräuchlichsten Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung von Proteinen.

2.6.2 Silbernitrat

Die Silberfärbung wurde 1988 von Rabillud eingeführt und dient ebenfalls der Visualisierung von Proteinen, wie auch von Glykolipiden, Lipiden, Lipopolysacchariden und Nukleinsäuren. Sie ist 10 - 100 mal sensitiver als die Coomassie - Färbung, jedoch zeit- und arbeitsaufwendiger und nicht für alle Proteine einsetzbar. Silberionen lagern sich an Asp-, Cys- und Glu - Reste der Proteine an und werden durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, was eine Schwarzfärbung hervorruft.

2.6.3 Ponceau - S - Rot

Dieser Azofarbstoff bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen und dient der Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulose - Membranen.

2.7 Enzym - Linked - Immuno - Sorbent - Assay (ELISA)

Dieses Sandwich - Verfahren dient der schnellen und systemischen Quantifizierung von Proteinen und kam in der vorliegenden Arbeit als industriell vorgefertigtes ELISA - KIT zum Einsatz. Die darin enthaltenen Substanzen wurden am Vortag des Versuches aus der Pulverform in Lösung gebracht. So werden die Standard - Reihe, sowie der Sekundär - Antikörper und das Peroxidase - Konjugat in je 1 ml Reinstwasser gelöst. Des Weiteren werden 10 ml Verdünnungs - Puffer - Konzentrat zu 90 ml Reinstwasser gegeben, wovon 11 ml zu der nun vorliegenden Sekundär - Antikörper - Lösung und 23 ml zur Peroxidase - Konjugat - Lösung hinzugegeben werden. Dann erfolgt die Verdünnung von 20 ml konzentriertem 40 x Wasch - Puffer mit 780 ml Reinstwasser und abschließend, aus dem beigefügten Standard, die Erstellung einer Protein - Standard - Verdünnungsreihe zwischen 6,3 und 400 ng / ml in acht Eppendorf - Tubes.

Ein Tube wird dabei ausschließlich mit 500 µl Verdünnungs - Puffer gefüllt und dient als Kontrolle. Die Proben werden in eine spezielle 96 - Well - Mikrotiterplatte zu je 100 µl pro Well einpipettiert. Wobei jede Eingabe als Doppelbestimmung in ein weiteres Well zweifach erfolgt. Am Boden jedes Wells ist bereits ein monoklonaler Primär - Antikörper gegen das Surfactant - Protein - Antigen industriell vorgebunden, an dem sich das gesuchte Protein nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur spezifisch bindet. Danach wird die Platte umgestürzt, wodurch sich die Wells entleeren und über Zellstoff trocken geklopft werden. Um ungebundene Bestandteile zu entfernen, erfolgt eine viermalige Waschung mit je 200 µl Wasch - Puffer. Damit bleiben auf dem Boden der Wells nur Antikörper - Antigen - Bindungen erhalten. Nun werden jeweils 100 µl des biotinylierten Sekundär - Antikörpers hinzupipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird mit je 200 µl Wasch - Puffer viermal gewaschen und die Platte anschließend auf dem Kopf stehend trocken geklopft. Nun befindet sich der Sekundär - Antikörper ebenfalls am gesuchten Antigen, das über die Bindung am Primär - Antikörper auf dem Boden des Wells haftet. Der Sekundär - Antikörper bindet so an Primär - Antikörper gebundenem Surfactant - Protein, jedoch an anderer Bindungsstelle. Pro Well werden 100 µl des Enzyms Streptavidin - Peroxidase - Konjugat einpipettiert, das nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur spezifisch an den Sekundär - Antikörper bindet. Nach bekannter Waschung und Trocknung folgen 100 µl des Substrats Tetramethylbenzidin in jedes Well mit lichtgeschützter Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur. Es kommt zur Enzym - Substrat - Reaktion und einem Farbumschlag proportional zur Proteinkonzentration, die durch Zugabe von 100 µl Citrat - Acid - Stop - Solution gestoppt wird. Mittels Spektrophotometrie wird die Absorption des Lichtes bei 450 nm gemessen und anhand der Kalibrierungskurve der Standard - Verdünnungsreihe in die Proteinkonzentration umgerechnet.

2.8 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe der SPSS - Software (IBM SPSS Statistics 19, USA). Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als direkter Zahlenwert, in Prozent oder als Mittelwert angegeben. Zur Auswertung der anamnestisch erhobenen Daten werden Vier - Felder - Kreuztabellen erstellt und über den Chi - Quadrat - Test nach Pearson oder Fisher - Exakt - Test die Signifikanz ermittelt. Die Auswertung der ELISA - Daten erfolgt nach Überprüfung auf Normalverteilung (Kolmogorow - Smirnov - Anpassungstest) entweder mittels Mann - Whitney - U - Test oder t - Test nach Student. Ein p - Wert unter 0.05 wird als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Western - Blot - Analysen zum Nachweis der Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit auf Proteinebene

Zum Nachweis der Surfactant - Proteine erfolgt die Proteinisolierung aus Tränendrüse und Tränenflüssigkeit von Körperspendern (2.2.3). Nach elektrophoretischer Auftrennung (2.4) erfolgt der Proteintransfer auf eine Nitrozellulose - Membran (2.5), wo über Antikörperreaktionen alle vier Surfactant - Proteine bei ihrem jeweiligen Molekulargewicht nachgewiesen werden (Abbildung 7).

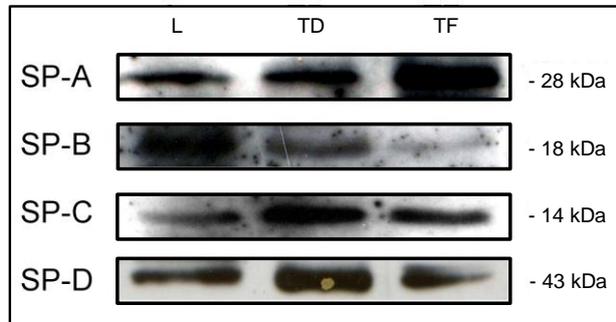


Abbildung 7: Western - Blot - Analysen von Tränendrüse (TD) und Tränenflüssigkeit (TF) mit charakteristischen Größenbanden in Kilodalton (kDa) für die Surfactant - Proteine SP - A (28 kDa), SP - B (18 kDa), SP - C (14 kDa) und SP - D (43 kDa). Lunge (L) als Positivkontrolle.

3.2 Vergleichende Analysen der Entnahmetechniken (Kapillare versus Schirmer - Streifen) in Bezug auf die Gewinnung von Tränenflüssigkeit und deren Potential zur Untersuchung von Proteinen unterschiedlichster Eigenschaften

3.2.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford in Tränen aus Kapillare und Schirmer - Streifen

Nach Entnahme eigener Tränenflüssigkeit mittels Kapillare und Schirmer - Streifen (2.2.4) wird diese nach Bradford auf ihre Gesamtproteinkonzentration hin untersucht (2.3). Mit beiden Entnahmetechniken kann annähernd die gleiche Proteinmenge in μg pro μl Tränenflüssigkeit aus dem Bindehautsack abgeerntet werden (Kapillare: $4,8 \mu\text{g} / \mu\text{l}$, Schirmer - Streifen: $4,6 \mu\text{g} / \mu\text{l}$). So dienen beide Techniken im gleichen Maß der Entnahme von Tränenflüssigkeit sowie der Gewinnung von Proteinen. Dadurch ist es mit beiden Verfahren möglich, Proteine in Tränenflüssigkeit zu analysieren (Abbildung 8).

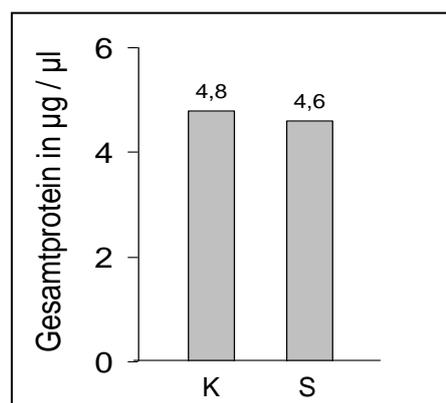


Abbildung 8: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford in Tränen aus Kapillare (K) und Schirmer -Streifen (S). Angabe der Proteinmenge in μg pro μl Tränenflüssigkeit.

3.3.2 Proteinnachweis in Tränenflüssigkeit nach SDS - Gelelektrophorese durch Gel- und Membrananfärbung

Die Proteine der mittels Kapillare und Schirmer - Streifen entnommenen Tränenflüssigkeit werden durch die SDS - Gelelektrophorese nach Größe, Ladung und anderer Eigenschaften aufgetrennt (2.4). Diese elektrophoretische Proteinauftrennung im Gel kann durch Anfärbung mit Coomassie (2.6.1) und Silbernitrat (2.6.2), wie auch der erfolgreiche Proteinblot (2.5) auf die Membran mit Ponceau (2.6.3), visualisiert werden. Dabei zeigt sich, dass mit beiden Entnahmetechniken ein annähernd gleich breites Spektrum an unterschiedlich großen Proteinen aufgenommen und für weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden kann (Abbildung 9).

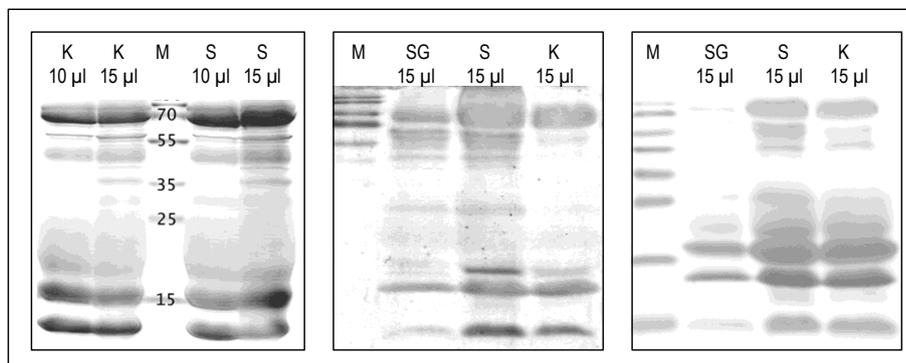


Abbildung 9: Färbung von Proteinen aus Tränen nach Entnahme aus dem Bindehautsack mittels Kapillare (K) und Schirmer - Streifen (S): Nachweis der Proteinauftrennung nach SDS - Gelelektrophorese im Gel durch Coomassie (links) und Silber (mitte), bzw. dem Proteinblot auf die Membran durch Ponceau (rechts). Proteinmarker (M). Schirmer - Streifen gewaschen (SG).

3.3.3 Western - Blot - Analysen zum Nachweis der Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D in Tränenflüssigkeit aus Kapillare und Schirmer - Streifen

Nach der Tränengewinnung mittels Kapillare und Schirmer - Streifen (2.2.4) können durch Western - Blot - Analysen (2.5) sowohl die sehr kleinen und lipophilen (SP - B: 18 kDa, SP - C: 14 kDa) als auch die deutlich größeren und hydrophilen Surfactant - Proteine (SP - A: 28 kDa, SP - D: 43 kDa) eindeutig detektiert werden. Allerdings zeigen die Kapillar - Tränen bei allen vier Proteinen intensivere Banden (Abbildung 10).

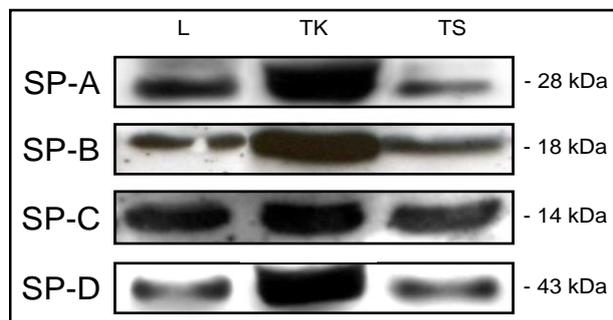


Abbildung 10: Western - Blot zum Vergleich der Tränenentnahme durch Kapillare (TK) und Schirmer - Streifen (TS). Mit beiden Methoden können Surfactant - Proteine mit ihren charakteristischen Banden (SP - A: 28 kDa, SP - B: 18 kDa, SP - C: 14 kDa, SP - D: 43 kDa) nachgewiesen werden. Lunge (L) als Positivkontrolle.

3.4 Auswertung der Probanden - Daten

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen die Präsenz der bisher bekannten Surfactant - Proteine A, - B, - C und - D im okulären Milieu. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit den untersuchten Entnahmetechniken (Kapillare und Schirmer - Streifen) Verfahren zur Verfügung stehen, um in ausreichender Menge Tränenflüssigkeit von Probanden zu gewinnen und Proteine der Augenoberfläche molekularbiologisch zu analysieren. So können nun in Tränenflüssigkeit die Gesamtkonzentration von Proteinen bestimmt, und auch hydro-, und lipophile Proteine unterschiedlichster Größe untersucht werden. Im praktisch, klinischen Umgang am Probanden oder Patienten zeigt sich der Schirmer - Streifen als vorteilhaft. Die Tränengewinnung ist deutlich angenehmer, einfacher, günstiger, schneller und von jedermann beherrschbar. Die Manipulation am Probandenaugen beschränkt sich auf das Einhängen in und die Entnahme aus dem Bindehautsack. Die dadurch freie zeitliche und personelle Kapazität des Untersuchers kann z.B. für anamnestische Erhebungen genutzt werden. Zugleich lässt sich der Streifen neben der schonenden, nicht invasiven Probengewinnung und als molekularbiologisches Quantifizierungssystem, parallel im Schirmer - Test für diagnostische Zwecke, auch bei einer großen Probandenpopulation, einsetzen. Bei der Kapillare ist ein ständiges und geübtes Arbeiten am geöffneten Auge notwendig, wodurch der Proband vermehrt zwinkern muss. Es kann dabei zu mechanischen Irritationen und Verletzungen der Augenoberfläche, bis hin zur Erblindung kommen. Basierend auf diesen Vorbetrachtungen wurde in dieser Arbeit zur weiteren Klärung physiologischer und pathologischer Fragestellungen zur Augenoberfläche, sowie zur Rolle des okulären - Surfactant - Systems im Rahmen der Pathogenese des Trockenen Auges der Schirmer - Streifen verwendet.

3.3.1 Die statistische Auswertung der anamnestischen Befragung von 306 Probanden mit und ohne Trockenem Auge

Nach Genehmigung der Ethikkommission (2.2.1) erfolgte in der Zeit zwischen Einhängen und Entnahme des Schirmer - Streifens die anamnestische Befragung der 306 Probanden nach einem eigens erstellten Fragebogen mit 50 Items (2.2.2). Zudem können in einem Extrafeld, neben dem Kreuz bei ja oder nein, weitere Informationen handschriftlich notiert werden. Die Teilnahme erfolgte nach Aufklärung durch den Arzt, sowie den Autor dieser Arbeit und freiwilliger Zustimmung durch den Probanden / Patienten verbal und per Unterschrift. Die Auswertung der anamnestisch erhobenen Daten erfolgt durch die Statistik - Software SPSS (2.8) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Statistische Auswertung der anamnestischen Daten von 306 Probanden mit (n = 170) und ohne (n = 136) Trockenem Auge mittels SPSS - Software.

Charakteristika	Trockenes Auge		P Value	95 % KI
	Nein 136	ja 170		
Weiblich: Total - Anzahl (%)	74 (54)	100 (59)		
< 40 Jahre - Anzahl (%)	25 (18)	13 (8)		
≥ 40 Jahre - Anzahl (%)	49 (36)	87 (51)		
Männlich: Total - Anzahl (%)	62 (46)	70 (41)		
< 40 Jahre - Anzahl (%)	19 (14)	7 (4)		
≥ 40 Jahre - Anzahl (%)	43 (32)	63 (37)		
Allergie - Anzahl (%)	44 (32)	56 (33)	0,913	0,635 - 1,662
Chemikalie - Anzahl (%)	5 (4)	8 (8)	0,657	0,413 - 4,049
Hausstaub - Anzahl (%)	9 (7)	12 (7)	0,879	0,438 - 2,624
Lebensmittel - Anzahl (%)	7 (5)	10 (6)	0,780	0,427 - 3,110
Medikament - Anzahl (%)	10 (7)	9 (5)	0,458	0,278 - 1,786
Nickel - Anzahl (%)	1 (1)	3 (2)	0,431	0,249 - 23,58
Pflanze - Anzahl (%)	15 (11)	19 (11)	0,968	0,495 - 2,081
Pflaster - Anzahl (%)	2 (1)	5 (3)	0,393	0,388 - 10,63
Sonnenlicht - Anzahl (%)	3 (2)	2 (1)	0,480	0,087 - 3,204
Tierhaar - Anzahl (%)	4 (3)	10 (6)	0,221	0,632 - 6,727
Atemwegserkrankung - Anzahl (%)	16 (12)	42 (25)	0,004	1,314 - 4,608
Asthma bronchiale - Anzahl (%)	6 (4)	15 (9)	0,129	0,791 - 5,559
Bronchitis, chronische - Anzahl (%)	3 (2)	10 (6)	0,113	0,747 - 10,275
Lungen-Krebs - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611
Lungen-TBC - Anzahl (%)	2 (1)	2 (1)	0,822	0,111 - 5,737
Tonsillektomie - Anzahl (%)	5 (4)	15 (9)	0,070	0,898 - 7,163
Augenerkrankung - Anzahl (%)	53 (39)	80 (47)	0,156	0,881 - 2,200
Durchblutungsstörung - Anzahl (%)	5 (4)	6 (4)	0,945	0,286 - 3,211
Glaukom - Anzahl (%)	26 (19)	43 (25)	0,199	0,827 - 2,482
Katarakt - Anzahl (%)	24 (18)	40 (24)	0,209	0,816 - 2,528
Augen-Irritation - Anzahl (%)	70 (51)	119 (70)	0,001	1,375 - 3,519
Bildschirmarbeit - Anzahl (%)	18 (13)	43 (25)	0,009	1,213 - 4,063
Chemikalie - Anzahl (%)	33 (24)	48 (28)	0,434	0,734 - 2,055
Entzündung, chronische - Anzahl (%)	5 (4)	24 (14)	0,002	1,597 - 11,614
Klimaanlage - Anzahl (%)	4 (3)	23 (14)	0,001	1,740 - 15,318
Kosmetika - Anzahl (%)	18 (13)	27 (16)	0,516	0,650 - 2,357
Operation - Anzahl (%)	17 (12)	32 (19)	0,134	0,858 - 3,070
Verletzung - Anzahl (%)	9 (7)	13 (8)	0,729	0,484 - 2,821
Gynäkologische Erkrankung - Anzahl (%)	6 (4)	22 (13)	0,010	1,267 - 8,187
Brustkrebs - Anzahl (%)	0 (0)	3 (2)	0,120	0,498 - 0,610
Hysterektomie - Anzahl (%)	2 (1)	12 (7)	0,020	1,119 - 23,140
Myom - Anzahl (%)	3 (2)	12 (7)	0,051	0,931 - 12,183
Hauterkrankung - Anzahl (%)	32 (24)	69 (41)	0,002	1,346 - 3,663
Basaliom - Anzahl (%)	2 (1)	3 (2)	0,840	0,198 - 7,307
Gürtelrose - Anzahl (%)	0 (0)	3 (2)	0,120	0,498 - 0,610
Neurodermitis - Anzahl (%)	7 (5)	5 (3)	0,323	0,173 - 1,800
Rosacea - Anzahl (%)	1 (1)	3 (2)	0,431	0,249 - 23,580
Schuppenflechte - Anzahl (%)	2 (1)	6 (4)	0,262	0,487 - 12,343
Trockene Haut - Anzahl (%)	19 (14)	59 (35)	0,0001	1,835 - 5,838
Herz/Kreislaufenerkrankung - Anzahl (%)	62 (46)	110 (65)	0,001	1,380 - 3,471
Anämie - Anzahl (%)	5 (4)	3 (2)	0,298	0,110 - 2,006
Angina Pectoris - Anzahl (%)	1 (1)	5 (3)	0,167	0,472 - 35,439
Bypass - Anzahl (%)	3 (2)	5 (3)	0,689	0,315 - 5,724
Herzinfarkt - Anzahl (%)	2 (1)	6 (4)	0,262	0,487 - 12,343
Herzinsuffizienz - Anzahl (%)	3 (2)	4 (2)	0,932	0,235 - 4,856
Herzklappenfehler - Anzahl (%)	3 (2)	3 (2)	0,782	0,159 - 4,010
Herzrhythmusstörung - Anzahl (%)	6 (4)	23 (14)	0,007	1,339 - 8,583
Hypertonie mit AM - Anzahl (%)	33 (24)	74 (44)	0,0001	1,466 - 3,949
Hypertonie ohne AM - Anzahl (%)	15 (11)	16 (9)	0,641	0,398 - 1,763
Hypotonie - Anzahl (%)	8 (6)	6 (4)	0,328	0,198 - 1,730
Koronare Herzkrankheit - Anzahl (%)	2 (1)	4 (2)	0,580	0,291 - 8,949
Kontaktlinse - Anzahl (%)	10 (7)	14 (8)	0,775	0,486 - 2,632

Fortsetzung Seite 30

Leber/Milzkrankung - Anzahl (%)	8 (6)	18 (11)	0,142	0,797 - 4,502
Fettleber - Anzahl (%)	2 (1)	10 (6)	0,048	0,902 - 19,444
Leberentzündung - Anzahl (%)	4 (3)	4 (2)	0,749	0,195 - 3,240
Leberkrebs - Anzahl (%)	1 (1)	1 (1)	0,874	0,050 - 12,889
Leberzirrhose - Anzahl (%)	1 (1)	2 (1)	0,697	0,144 - 17,914
Splenektomie - Anzahl (%)	0 (0)	2 (2)	0,204	0,499 - 0,611
Magen/Darmerkrankung - Anzahl (%)	30 (22)	71 (42)	0,0001	1,526 - 4,208
Appendizitis - Anzahl (%)	10 (7)	28 (16)	0,016	1,161 - 5,317
Darmdivertikel - Anzahl (%)	0 (0)	3 (2)	0,120	0,498 - 0,610
Darmpolyp - Anzahl (%)	1 (1)	3 (2)	0,431	0,249 - 23,580
Gastritis - Anzahl (%)	1 (1)	2 (1)	0,697	0,144 - 17,914
Magenulcus - Anzahl (%)	0 (0)	5 (3)	0,044	0,495 - 0,607
Morbus Crohn - Anzahl (%)	2 (1)	2 (1)	0,822	0,111 - 5,737
Neurologische Erkrankung - Anzahl (%)	11 (8)	31 (18)	0,010	1,222 - 5,254
Demenz - Anzahl (%)	1 (1)	3 (2)	0,431	0,249 - 23,580
Depression - Anzahl (%)	0 (0)	13 (8)	0,001	0,482 - 0,596
Kopfschmerz - Anzahl (%)	1 (1)	3 (2)	0,431	0,249 - 23,580
Multiple Sklerose - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611
Schlaganfall - Anzahl (%)	3 (2)	6 (4)	0,496	0,398 - 6,608
Tinnitus - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611
Orthopädische Erkrankung - Anzahl (%)	24 (18)	57 (34)	0,002	1,367 - 4,055
Arthrose - Anzahl (%)	13 (10)	29 (17)	0,058	0,969 - 3,909
Bandscheibenprolaps - Anzahl (%)	1 (1)	7 (4)	0,065	0,705 - 47,708
Morbus Scheuermann - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611
Osteoporose - Anzahl (%)	2 (1)	13 (8)	0,013	1,230 - 25,024
Rheuma - Anzahl (%)	5 (4)	8 (5)	0,657	0,413 - 4,049
Pankreas/Gallenerkrankung - Anzahl (%)	8 (6)	27 (16)	0,006	1,325 - 6,888
Gallenblasenentfernung - Anzahl (%)	5 (4)	23 (14)	0,003	1,515 - 11,092
Gallensteine - Anzahl (%)	7 (5)	16 (9)	0,160	0,764 - 4,797
Pankreasinsuffizienz - Anzahl (%)	0 (0)	4 (2)	0,072	0,496 - 0,609
Raucher - Anzahl (%)	30 (22)	34 (20)	0,660	0,508 - 1,535
Schilddrüsenerkrankung - Anzahl (%)	23 (17)	45 (26)	0,046	1,007 - 3,106
Hashimoto Thyreoiditis - Anzahl (%)	1 (1)	1 (1)	0,874	0,050 - 12,889
Hyperthyreose - Anzahl (%)	5 (4)	9 (5)	0,501	0,479 - 4,477
Hypothyreose - Anzahl (%)	7 (5)	7 (4)	0,668	0,271 - 2,314
Struma - Anzahl (%)	4 (3)	7 (4)	0,583	0,406 - 4,945
Thyreodektomie - Anzahl (%)	4 (3)	11 (6)	0,155	0,710 - 7,337
Stoffwechselstörung - Anzahl (%)	36 (26)	73 (43)	0,003	1,284 - 3,403
Diabetes Mellitus - Anzahl (%)	26 (19)	34 (20)	0,847	0,599 - 1,869
Gicht - Anzahl (%)	11 (8)	27 (16)	0,040	1,023 - 4,502
Hyperlipidämie - Anzahl (%)	11 (8)	35 (21)	0,002	1,434 - 6,052
Uro/Genitalerkrankung - Anzahl (%)	10 (7)	31 (18)	0,005	1,324 - 5,964
Nephrektomie - Anzahl (%)	0 (0)	3 (2)	0,120	0,498 - 0,610
Nephrolithiasis - Anzahl (%)	0 (0)	6 (4)	0,027	0,493 - 0,606
Nierenentzündung - Anzahl (%)	0 (0)	3 (2)	0,120	0,498 - 0,610
Niereninsuffizienz - Anzahl (%)	4 (3)	6 (4)	0,774	0,334 - 4,367
Nierenkrebs - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611
Nierenzyste - Anzahl (%)	1 (1)	6 (4)	0,104	0,587 - 41,529
Prostatahyperplasie - Anzahl (%)	1 (1)	5 (3)	0,167	0,472 - 35,439
Schrumpfniere - Anzahl (%)	0 (0)	2 (1)	0,204	0,499 - 0,611

% = Prozent, AM = Arzneimittel, KI = Konfidenzintervall

Probanden mit einem Trockenen Auge unterscheiden sich zu ihrer diesbezüglich gesunden Vergleichsgruppe signifikant ($p < 0,05$) in folgenden Punkten. So berichten sie häufiger von Erkrankungen der Atemwege ($p < 0,004$) und ihre Augen sind vermehrt irritativen Einflüssen ($p < 0,001$), wie Bildschirmarbeit ($p < 0,009$), chronischer Entzündung ($p < 0,002$) oder Klimaanlage ($p < 0,001$) ausgesetzt.

Gynäkologische Erkrankungen sind bei betroffenen Frauen präsenter ($p < 0,01$), wobei vor allem die Gebärmutterentfernung häufiger vorliegt ($p < 0,02$). Zudem treten Hauterkrankungen ($p < 0,002$), wie eine Trockene Haut ($p < 0,0001$) verstärkt auf. Unter den häufiger auftretenden Herz - Kreislauf - Erkrankungen ($p < 0,001$), leiden die Betroffenen vermehrt am medikamentenbedürftigen Hypertonus ($p < 0,0001$), sowie an Herzrhythmusstörungen ($p < 0,007$). Neben einer Fettleber ($p < 0,048$), beklagen Betroffene Beschwerden im Verdauungssystem. So etwa Erkrankungen des Magen - Darm - Traktes ($p < 0,0001$), wie Appendizitis ($p < 0,016$) und Magenulcus ($p < 0,044$), aber auch des Pankreas - Gallen - Systems ($p < 0,006$), wobei gehäuft eine Gallenblasenentfernung vorliegt ($p < 0,003$). Neben Erkrankungen aus dem Fachgebiet der Neurologie ($p < 0,01$), wie die Depression ($p < 0,001$), treten ebenso orthopädische Beschwerden ($p < 0,002$), wie Osteoporose ($p < 0,013$) gehäuft auf. Im Allgemeinen leiden Probanden mit Trockenen Augen ebenso häufiger an Erkrankungen der Schilddrüse ($p < 0,046$), wie auch des Stoffwechsels ($p < 0,003$), darunter Hyperlipidämie ($p < 0,002$) und Gicht ($p < 0,04$). Es zeigen sich zudem Häufungen Uro - Genitaler - Erkrankungen ($p < 0,005$), wie etwa der Nephrolithiasis ($p < 0,027$).

Folgende Aspekte zeigen keine Signifikanz ($p \geq 0,05$) im Zusammenhang mit einem Trockenen Auge. So etwa Allergien. Wobei insbesondere Allergien gegen Chemikalien, Hausstaub, Lebensmittel, Medikamente, Nickel, Pflanzen (Gräser, Pollen), Pflaster, Sonnenlicht und Tierhaare erfragt wurden. Ebenfalls nicht gehäuft sind Asthma bronchiale, chronische Bronchitis, Lungenkrebs, -tuberkulose oder die Tonsillektomie. Augenerkrankungen wie Durchblutungsstörungen, Glaukom oder Katarakt treten ebenso wenig vermehrt auf. Irritative Einflüsse auf das Auge, wie Chemikalien, Kontaktlinsen, Kosmetika, Operationen, Rauchen bzw. Verletzungen scheinen nicht im Zusammenhang mit einem Trockenen Auge zu stehen. Ebenso sind Frauen mit einem Myom oder Brustkrebs nicht auffallend vermehrt betroffen. Im dermatologischen Formenkreis spielen das Basaliom, sowie die Gürtelrose, Neurodermitis, Rosacea oder eine Schuppenflechte keine Rolle in der Pathogenese des Trockenen Auges. Die internistischen Erkrankungen Anämie, Angina pectoris, Herzinsuffizienz, Hypotonie, Koronare Herzkrankheit, sowie ein Bypass, Herzinfarkt, Herzklappenfehler und Hypertonus ohne Medikation zeigen keinen Einfluss in Bezug auf ein Trockenes Auge. Auch Diabetes mellitus und einige Erkrankungen des Verdauungstraktes, wie Darmdivertikel, Darmpolypen, Gallensteinleiden, Gastritis, Morbus Crohn und Pankreasinsuffizienz treten nicht vermehrt auf. Ebenso wenig Erkrankungen der Milz oder der Leber, wie Leberentzündung, -krebs oder -zirrhose. Für Erkrankungen, wie Demenz, Kopfschmerz, Multiple Sklerose, Schlaganfall und Tinnitus kann auch keine Häufung bei Trockenen Augen festgestellt werden.

Im orthopädischen Fachbereich waren unauffällig Arthrose, Bandscheibenbeschwerden, sowie Morbus Scheuermann und Rheuma. Auch wenn zusammenfassend Erkrankungen der Schilddrüse bei Betroffenen signifikant verstärkt auftreten, kann dies nicht für die Untergruppen, Hashimoto Thyreoiditis, Hypothyreose, Hyperthyreose, Struma und Thyreodektomie bestätigt werden. Abschließend zeigt sich keine Auffälligkeit bei Nierenentzündung, -insuffizienz, -krebs, -zysten, Nephrektomien, Prostatahyperplasie oder Schrumpfnieren zwischen beiden Vergleichsgruppen.

3.3.2 Die graphischen Analysen der Probandendaten in Bezug auf die Verteilung von Geschlecht, Alter, symptomatischen Beschwerden eines Trockenen Auges, der gespendeten Tränenmenge und der Gesamtproteinkonzentration

Insgesamt sind unter den zufällig ausgewählten 306 Probanden 174 (57 %) Frauen und 132 (43 %) Männer. 242 (79 %) Teilnehmer sind ≥ 40 Jahre alt. Die übrigen 64 (21 %) Personen sind < 40 Jahre. So kommt in die Sprechstunden der niedergelassenen Augenärzte ein eher reiferes Klientengut, wobei Frauen häufiger als Männer vorstellig werden (Abbildung 11).

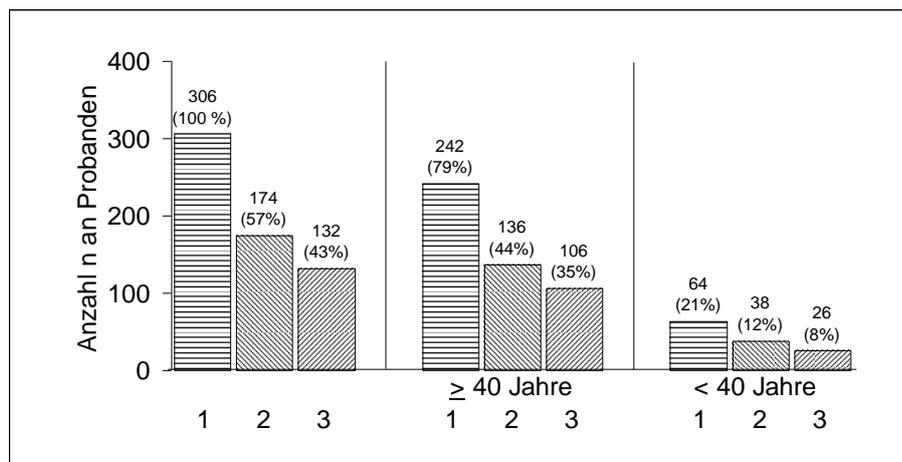


Abbildung 11: Graphische Analyse der Probandenpopulation nach Geschlecht und Alter. Neben der Gesamtbetrachtung (links), erfolgt die Unterteilung in eine Gruppe ≥ 40 Jahre (mitte) und < 40 Jahre (rechts). In allen drei Betrachtungsbereichen werden neben der Gesamtanzahl (1), der weibliche (2) und der männliche (3) Anteil getrennt erfasst.

Augenärztlich wurde bei 170 (56 %) Personen ein Trockenes Auge diagnostiziert. 136 (44 %) Teilnehmer sind diesbezüglich vom Augenarzt als gesund eingestuft. Unter den Erkrankten befinden sich 100 (59 %) Frauen, sowie 70 (41 %) Männer, die sich im Einzelnen wie folgt zusammensetzen: 51 % Frauen ≥ 40 Jahre, 37 % Männer ≥ 40 Jahre, 8 % Frauen < 40 Jahre sowie 4 % Männer < 40 Jahre. Beide Geschlechter zeigen eine deutliche Zunahme der Beschwerden ab dem 40. Lebensjahr.

Unter den 100 betroffenen Frauen sind 87 (87 %) Personen ≥ 40 Jahre und 13 (13 %) Personen < 40 Jahre. Bei den 70 betroffenen Männern sind 63 (90 %) ≥ 40 Jahre und 7 (10 %) < 40 Jahre. Unter den 136 Teilnehmern, die nicht an einem Trockenen Auge leiden, befinden sich 74 (54 %) Frauen und 62 (46 %) Männer. In dieser Vergleichsgruppe sind 36 % Frauen und 32 % Männer ≥ 40 Jahre, sowie 18 % Frauen und 14 % Männer < 40 Jahre. Von den 74 gesunden Frauen sind 49 (66 %) ≥ 40 Jahre und 25 (34 %) < 40 Jahre alt. Bei den Männern sind 43 (69 %), der beteiligten 62 Gesunden, ≥ 40 Jahre und 19 (31 %) < 40 Jahre (Abbildung 12).

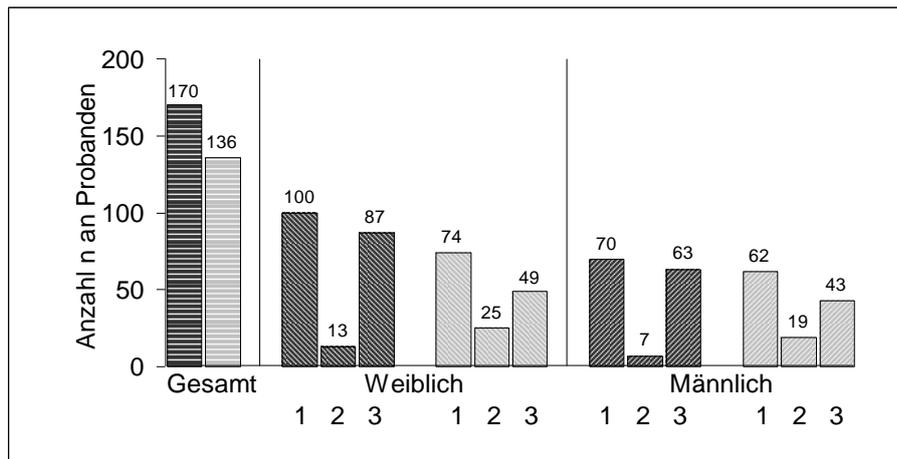


Abbildung 12: Graphische Analyse der Probandenpopulation in Bezug auf erkrankt am Trockenen Auge (schwarz) und diesbezüglich gesund (grau). Es erfolgt die getrennte Betrachtung der Anzahl (n) an Gesamtprobanden beider Gruppen (links), sowie die zusätzliche Separierung dieser nach Geschlecht, weiblich (mitte) und männlich (rechts), wobei hier neben der Gesamtdarstellung (1) die Verteilung zwischen Probanden < 40 Jahre (2) und ≥ 40 Jahre (3) aufgezeigt wird.

Die 170 Probanden mit einem Trockenen Auge sind mit durchschnittlich 60 Jahren 10 Jahre älter als ihre diesbezüglich gesunde Vergleichsgruppe. Betroffene Frauen sind im Durchschnitt 58 Jahre alt und damit 9 Jahre älter als gesunde Frauen. Erkrankte Männer mit einem Durchschnittsalter von 62 Jahren sind 12 Jahre älter als nicht erkrankte Männer. Des Weiteren sind Männer mit Trockenen Augen im Schnitt 4 Jahre älter als betroffene Frauen. Bei Probanden unter dem 40. Lebensjahr sind Frauen mit einem Trockenen Auge im Mittel 28 Jahren alt und somit 5 Jahre älter als nicht erkrankte Frauen. Ebenso 5 Jahre älter sind auch Männer mit einem Trockenen Auge in Bezug zu ihren, im Mittel 24 jährigen, gesunden Mitstreitern. Unter den Teilnehmern die ≥ 40 Jahre sind, zeigt sich zwischen erkrankten und gesunden Personen ein nicht so deutlicher Altersunterschied. Obwohl auch hier Probanden mit einem Trockenen Auge im Mittel immer älter sind als ihre diesbezüglich gesunde Vergleichsgruppe. So sind betroffene Frauen 63 und gesunde Frauen 62 Jahre im Durchschnitt. Männer mit einem Trockenen Auge waren ebenfalls mit einem Durchschnittsalter von 65 Jahren älter als gesunde Männer mit durchschnittlich 62 Jahren (Abbildung 13).

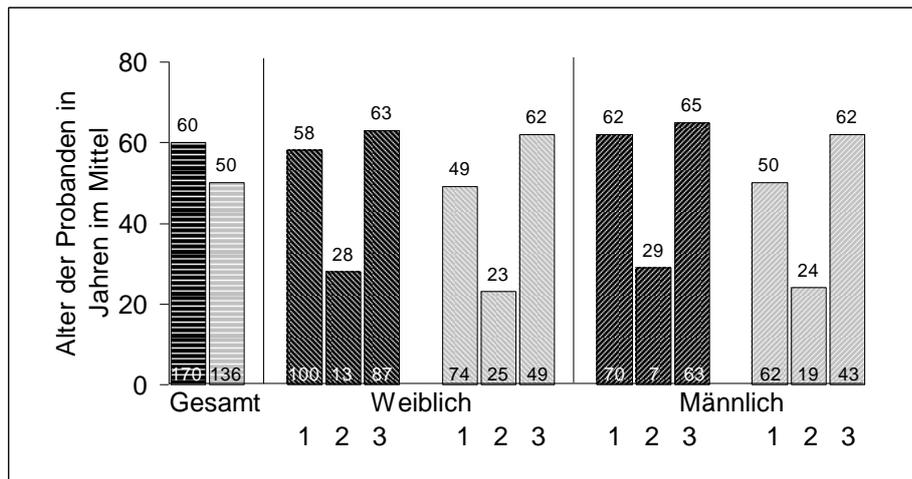


Abbildung 13: Graphische Analyse der Probandenpopulation in Bezug auf die Altersverteilung bei Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge in der Gesamtpopulation (links) sowie separate Betrachtung nach Geschlecht (weiblich (mitte), männlich (rechts)). Wobei hier neben der jeweiligen Gesamtgruppe (1) noch nach Alter unterteilt wird: < 40 Jahre (2), \geq 40 Jahre (3). Die Altersangaben sind Mittelwerte der entsprechenden Gruppe, deren Anzahl an eingeschlossenen Probanden am Diagrammboden angegeben wird.

So zeigt sich mit zunehmendem Alter ein vermehrtes Auftreten Trockener Augen. Wobei Frauen deutlich ab der 4. Lebensdekade und Männer etwas später ab 50 Jahren zunehmend von Trockenen Augen berichten. Ab dem 30. Lebensjahr steigt der Anteil Betroffener in der jeweiligen Altersgruppe auf 50 % stark an, was sich bis in die 7. Lebensdekade mit steigender Tendenz an Betroffenen auf 72 % fortsetzt. Bei der gesunden Vergleichsgruppe kommt es ebenfalls zu vermehrten Arztconsultationen mit dem Alter, was jedoch ihren Höhepunkt in der 5. Lebensdekade hat und dann wieder abnimmt (Abbildung 14).

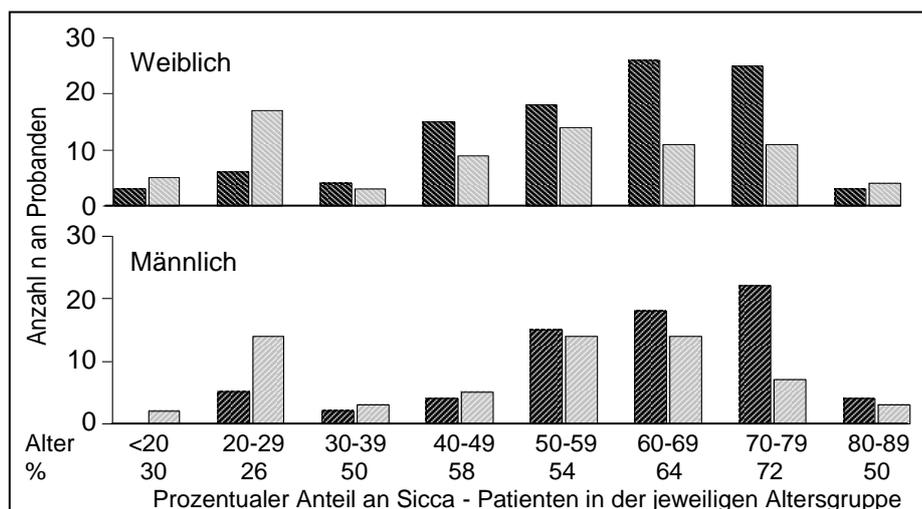


Abbildung 14: Graphische Analyse der Altersverteilung von weiblichen (oben) und männlichen (unten) Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge. Angaben zur prozentualen Verteilung von Sicca - Patienten in ihrer jeweiligen Altersgruppe erfolgen in Prozent unter der Angabe der entsprechenden Altersspannen.

Das Trockene Auge ist ein facetten- und kombinationsreiches Krankheitsbild, bei dem Betroffene vor allem unter subjektiven Symptomen leiden. Die in dieser Arbeit befragten 170 Probanden mit Trockenen Augen klagen über ein Gefühl der Augentrockenheit (43 %), eine Überempfindlichkeit der Augen gegen Luftzug und anderen Umwelteinflüssen (42 %) oder auch über ein vermehrtes Tränen der Augen (36 %). Einige berichten von Augenschmerzen (35 %) sowie von einem Gefühl eines Fremdkörpers bzw. Sandkorns auf der Augenoberfläche (32 %), was jedoch durch Inspektion nicht bestätigt werden kann. Neben einem verstärkten Juckreiz (31 %), geben Betroffene zudem Druckgefühl im Bereich der Augen an (6 %) (Abbildung 15).

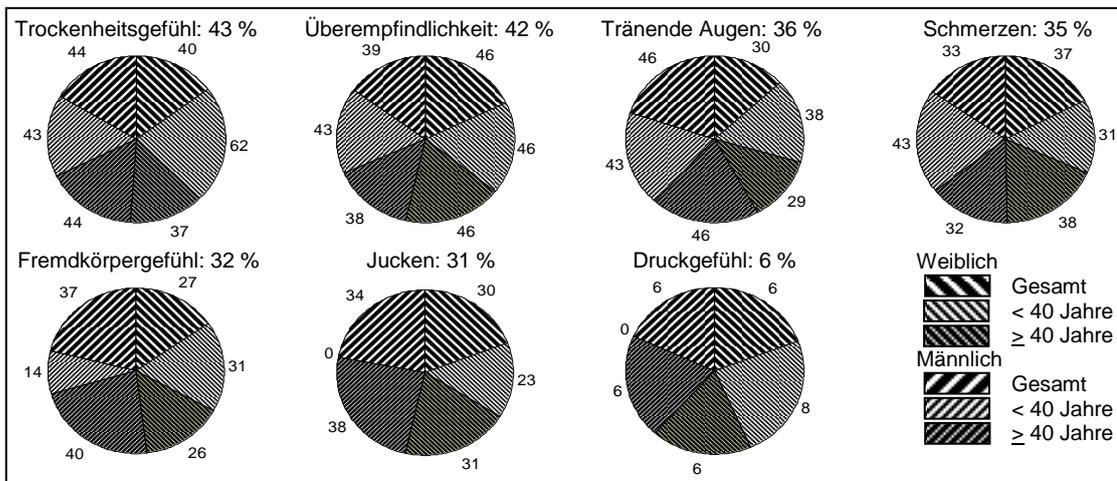


Abbildung 15: Graphische Analyse subjektiver Beschwerden bei 170 Probanden mit Trockenen Augen. Dabei spiegelt ein Kreisdiagramm ein Symptom wieder, dessen jeweiliger Name und Häufigkeit (in Prozent) in der Überschrift angegeben wird. Jedes Diagramm gibt zudem die Symptomverteilung (in Prozent) nach Geschlecht wieder, mit Unterteilung in Gesamt, < 40 Jahre und ≥ 40 Jahre.

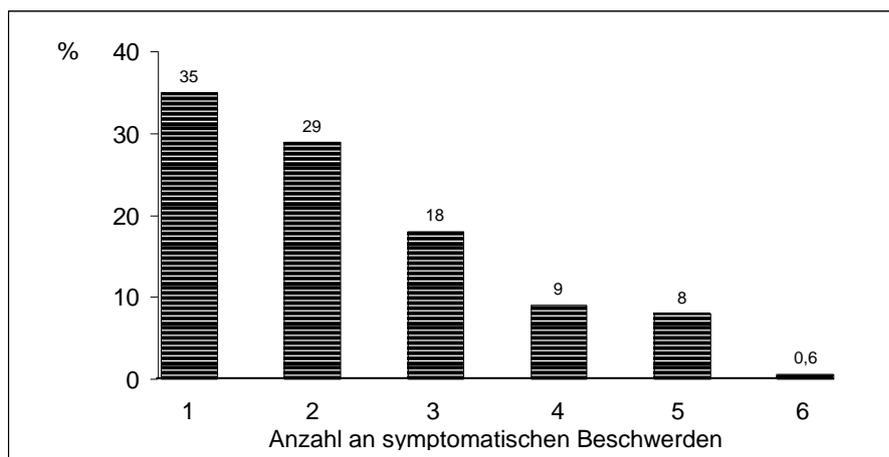


Abbildung 16: Graphische Analyse der Anzahl an subjektiven Beschwerden pro Betroffenem mit Trockenen Augen. Die Angaben erfolgen in Prozent nach Zusammenschluss der Betroffenen in Gruppen gleicher Beschwerdeanzahl.

Es zeigt sich, dass Personen mit Trockenen Augen an unterschiedlichen subjektiven Symptomen leiden. Wobei es häufig zu Kombinationen dieser Symptome kommt. Die Spanne der Beschwerden reicht von einem Symptom, bis zu Symptomkomplexen aus bis zu sechs verschiedenen Komponenten (Abbildung 16). So geben 59 (35 %) der 170 Betroffenen lediglich ein Symptom an. Mit 111 (65 %) Personen leiden jedoch die Mehrzahl unter mehr als einem Symptom. Dies zeigt sich auch bei separater Betrachtung der Symptomverteilung nach Geschlecht. So geben 39 (39 %), der betroffenen 100 Frauen ein Symptom des Trockenen Auges an, wohingegen 61 (61 %) an mehr als einem Symptom leiden. Bei den 70 erkrankten Männern geben 20 (29 %) Personen lediglich ein Symptom an, dagegen schildert die Mehrzahl von 50 (71 %) Betroffenen mehr als ein Symptom. Erkrankte Männer leiden im Vergleich zu Frauen häufiger unter mehr als einem Symptom (71 % vs. 61 %) (Abbildung 17).

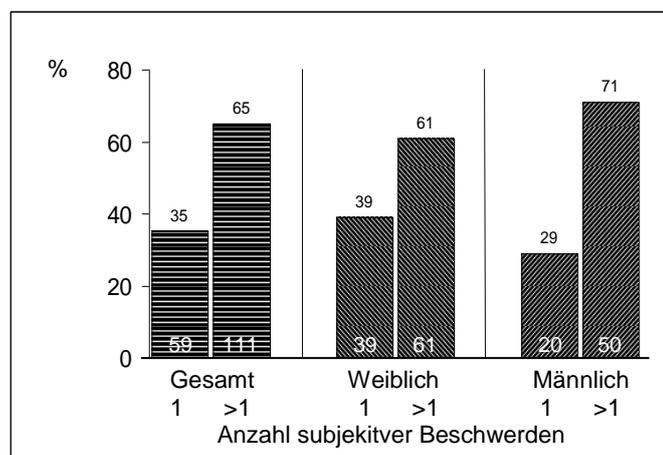


Abbildung 17: Graphische Analyse von Probanden mit einem (1) und mehr als einem (>1) Symptom eines Trockenen Auges. Die Angaben erfolgen in Prozent. Betrachtung der Gesamtgruppe mit Beschwerden (links), sowie Auftrennung nach Geschlecht in weiblich (mitte) und männlich (rechts). Anzahl der jeweils eingeschlossenen Probanden am Diagrammboden.

In Anlehnung an die Schirmer - I - Methode erfolgte bei jedem Teilnehmer nach 5 Min. das Ablesen und Addieren der Laufstrecken von Tränenflüssigkeit in den beiden Schirmer - Streifen (2.2.4.1). Im Mittel sind die Streifen bei Probanden mit Trockenen Augen 36 mm mit Tränen voll gesogen. Bei der diesbezüglich gesunden Vergleichsgruppe ergibt sich eine Laufstrecke von 47 mm. Somit nimmt der Streifen bei Betroffenen im Durchschnitt 11 mm weniger Tränen auf. Dies wird so auch in der Untergruppenanalyse der Geschlechter deutlich. Im Vergleich zwischen gesunden und betroffenen Frauen zeigt sich eine Differenz von 15 mm (51 vs. 36 mm).

Unter den männlichen Teilnehmern kann bei Gesunden ein Mehr von 7 mm gemessen werden (43 vs. 36 mm). Sowohl in der gesunden, als auch in der betroffenen Gruppe, zeigt sich bei beiden Geschlechtern eine vermehrte Tränenspende in der jüngeren (< 40 Jahre) Untergruppe (Gesund: weiblich 70 vs. 35 mm, männlich 56 vs. 29 mm; Erkrankt: weiblich 53 vs. 30 mm, männlich 40 vs. 35 mm). Im Seitenvergleich zwischen Streifen des linken und rechten Auges eines Probanden zeigt sich bei Trockenen Augen bei 27 % der Betroffenen eine Differenz von mehr als 5 mm. Bei Gesunden lag im Seitenvergleich bei 39 % ein Unterschied von mehr als 5 mm vor (Abbildung 18).

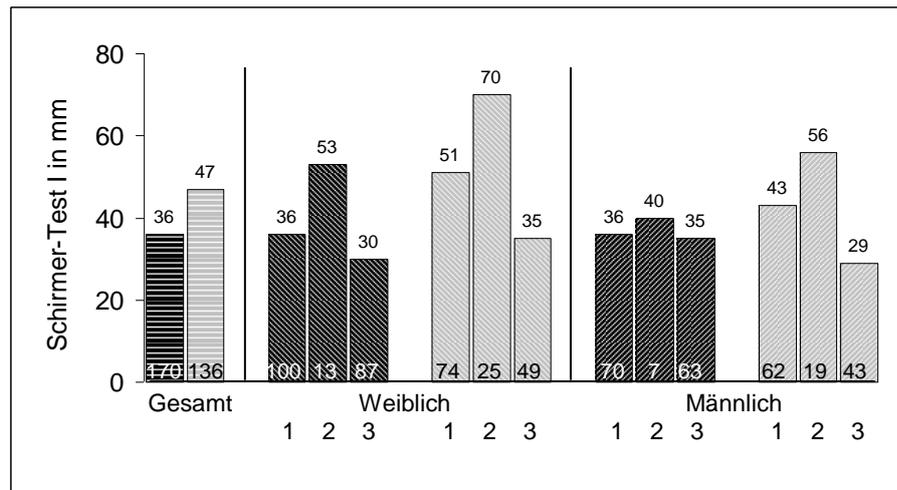


Abbildung 18: Graphische Analyse der Laufstrecke von Tränenflüssigkeit im Schirmer - Streifen beim Schirmer - Test - I in mm, bei Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge. Neben der jeweiligen Gesamtpopulation einer Gruppe (links) erfolgt die getrennte Auswertung nach Geschlecht, weiblich (mitte) männlich (rechts), mit Aufteilung nach Gesamtgruppe (1), < 40 Jahre (2) und \geq 40 Jahre (3). Die Angabe der Laufstrecke erfolgt als Mittelwert über dem jeweiligen Diagramm, wobei die Anzahl der eingeschlossenen Probanden am Diagrammboden zu finden ist.

Bei der separaten Betrachtung, wie viel Tränenflüssigkeit gespendet wurde, erfolgt die Gruppierung und prozentuale Darstellung nach Laufstrecke im Schirmer - Streifen in 20 mm Schritten. Dabei spenden doppelt so viel Probanden mit einem Trockenen Auge weniger als 20 mm als diesbezüglich Gesunde. In der Gruppe \geq 60 mm zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Hier spenden gesunde deutlich mehr als betroffene Probanden. Bei Probanden mit Trockenen Augen liefern über die Hälfte der Betroffenen aus beiden Augen Werte zwischen 20 - 39 mm. Mit abfallender Beteiligung, umso mehr Tränen gespendet werden. Interessanterweise lag bei Gesunden der Peak im selben Mengen-Niveau, jedoch deutlich niedriger. Bei ihnen nimmt die Anzahl im Bereich von 40 - 59 mm auf ca. 20 % ab, um dann bei \geq 60 mm wieder deutlich auf über 30 %, dem Peak gleichkommend, anzusteigen (Abbildung 19). Nach Extraktion der Tränen aus den Streifen erfolgt die Messung des gewonnenen Materials in μ l. Dabei entspricht das Verhältnis der voll gesogenen Streifen der Menge an erhaltener Tränenflüssigkeit mit ähnlichen Aussagen zu den Ergebnissen.

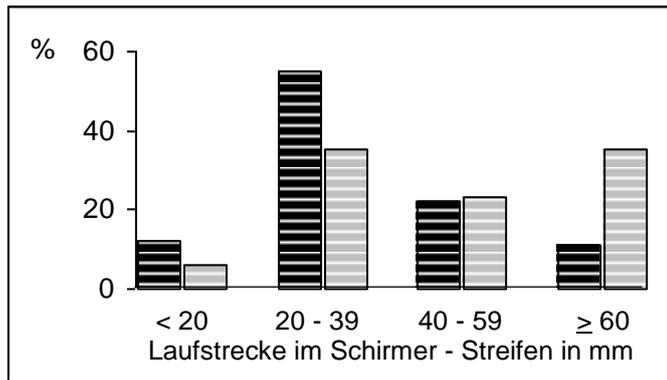


Abbildung 19: Graphische Auswertung des prozentualen Verteilungsmusters (in %) an gespendeter Tränenflüssigkeit von Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge nach Bestimmung der Laufstrecke im Schirmer-Streifen in mm.

So kann bei Probanden mit Trockenen Augen im Schnitt 35 μ l Tränenflüssigkeit, und damit 5 μ l weniger als in der gesunden Vergleichsgruppe mit 40 μ l, generiert werden. Das gleiche Bild ergibt sich bei separater Betrachtung der jeweiligen Geschlechter - Untergruppen. So liefern erkrankte Frauen und Männer im Durchschnitt 35 μ l und damit gegenüber ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe mit 40 μ l insgesamt 5 μ l weniger. Auch hier zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse bei den verschiedenen Altersgruppen, ungeachtet ob erkrankt oder nicht. Teilnehmer unter 40 Jahren spendeten immer mehr Tränenflüssigkeit (Erkrankt: weiblich 52 vs. 32 μ l, männlich 42 vs. 35 μ l; Gesund: weiblich 52 vs. 35 μ l, männlich 53 vs. 34 μ l) (Abbildung 20).

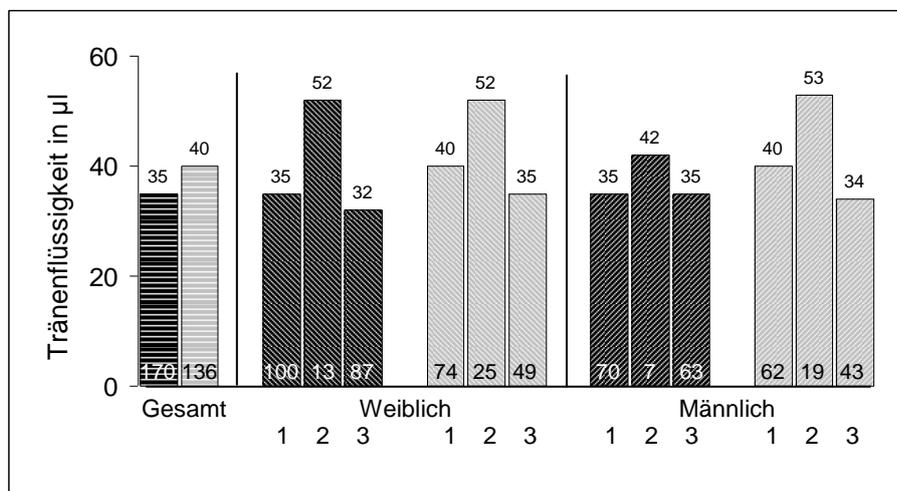


Abbildung 20: Graphische Analyse der Menge an Tränenflüssigkeit in μ l bei Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge. Neben der jeweiligen Gesamtpopulation einer Gruppe (links) erfolgt die getrennte Auswertung nach Geschlecht, weiblich (mitte) männlich (rechts), mit Aufteilung nach Gesamtgruppe (1), < 40 Jahre (2) und \geq 40 Jahre (3). Die Angabe der Tränenmenge erfolgt als Mittelwert über dem jeweiligen Diagramm, wobei die Anzahl der eingeschlossenen Probanden am Diagrammboden zu finden ist.

So nimmt die Menge an Tränenflüssigkeit auf der Augenoberfläche bei Trockenen Augen und mit steigendem Alter ab dem 40. Lebensjahr ab.

Aus der gewonnenen Tränenflüssigkeit wurde 1 µl zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford verwendet (2.3). Im Durchschnitt zeigen dabei Probanden mit Trockenem Auge einen Proteingehalt von 1,4 µg / µl und lagen damit niedriger als die nicht betroffene Vergleichsgruppe mit 1,7 µg / µl. Sowohl erkrankte Frauen (1,5 µg / µl) als auch Männer (1,4 µg / µl) liegen dabei im Mittel unterhalb der Werte von gesunden Frauen (1,8 µg / µl) und Männern (1,7 µg / µl). Ebenso hat das Alter einen Einfluss auf den Proteingehalt in Tränen. Es kommt ab dem 40. Lebensjahr in jeder Untergruppe zu einer Reduktion des Proteingehaltes. Sowohl bei weiblichen, als auch männlichen Teilnehmern, gesund oder an einem Trockenem Auge erkrankt (Erkrankt: weiblich 1,7 vs. 1,4 µg / µl, männlich 1,8 vs. 1,3 µg / µl; Gesund: weiblich 2 vs. 1,7 µg / µl, männlich 1,7 vs. 1,6 µg / µl). So reduziert sich die Proteinkonzentration in Tränenflüssigkeit mit dem Alter sowie beim Trockenem Auge (Abbildung 21).

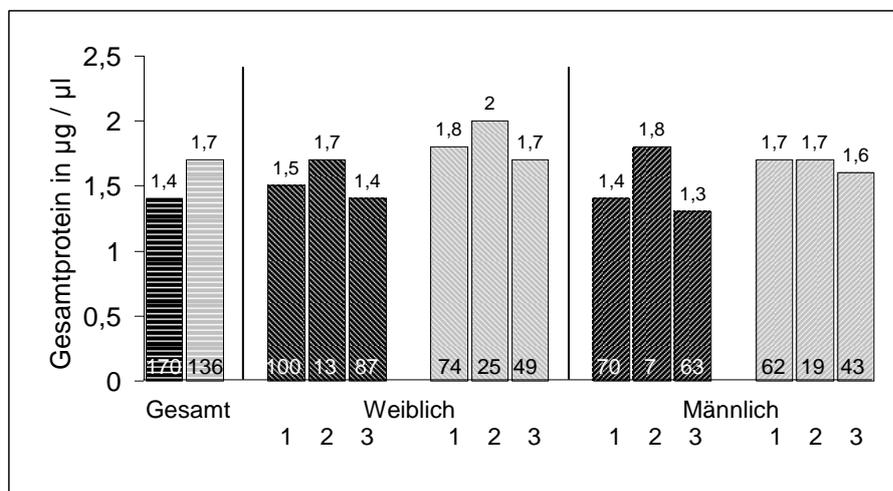


Abbildung 21: Graphische Analyse der Konzentration an Gesamtprotein (µg / µl) in Tränenflüssigkeit von Probanden mit (schwarz) und ohne (grau) Trockenem Auge. Neben der jeweiligen Gesamtpopulation einer Gruppe (links) erfolgt die getrennte Auswertung nach Geschlecht, weiblich (mitte) männlich (rechts), mit Aufteilung nach Gesamtgruppe (1), < 40 Jahre (2) und ≥ 40 Jahre (3). Die Angabe der Konzentration erfolgt als Mittelwert über dem jeweiligen Diagramm, wobei die Anzahl der eingeschlossenen Probanden am Diagrammboden zu finden ist.

Sowohl bei der Messung der Laufstrecke über den Schirmer - Streifen, als auch bei der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration zeigt sich eine Auffälligkeit innerhalb der gesunden Untergruppe. Männer spenden weniger Tränenflüssigkeit und diese weist eine geringere Konzentration an Gesamtproteinen auf. Abbildung 22 gibt zusammenfassend einen Überblick über das Verhalten der Menge an Tränen sowie der darin enthaltenen Gesamtproteine mit dem Alter und beim Trockenem Auge (Abbildung 22).

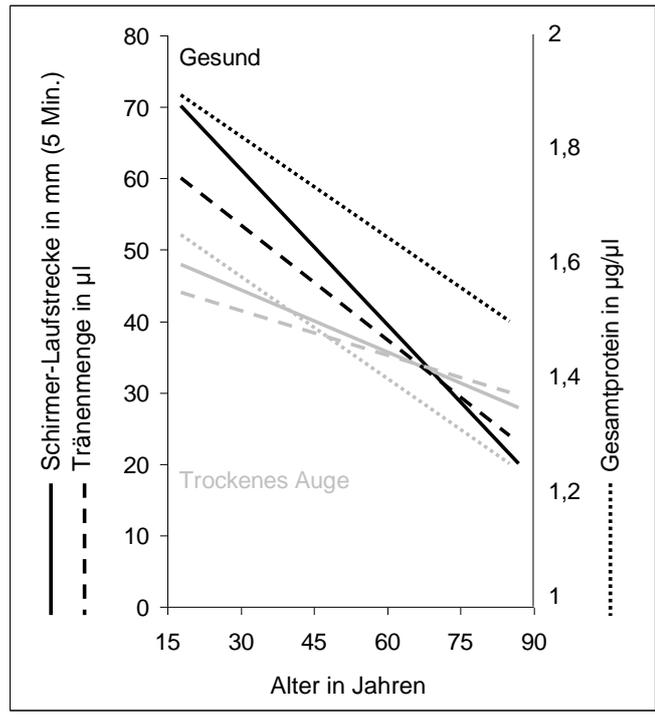


Abbildung 22: Graphische Zusammenfassung des Einflusses von Alter und Trockenem Auge (grau) auf die Tränensekretion und den Proteingehalt in Tränenflüssigkeit, in Bezug zu Gesunden (schwarz). Darstellung der Laufstrecke von Tränen im Schirmer - Streifen nach 5 Min. in mm (nach Schirmer - I), der gewonnenen Tränenmenge in µl sowie des Gesamtprotein-gehaltes in µg pro gespendeten µl Tränenflüssigkeit.

Bei der separaten Betrachtung der Gesamtproteinkonzentration in Tränen von Probanden mit einem Trockenem Auge (n = 170) fällt auf, dass es zu einem tendenziellen Abfall der Proteinkonzentration kommt, wenn die Beschwerden in der Anzahl zunehmen. Bei einer Schwere von mindestens fünf Symptomen stieg die Proteinmenge in den Tränen jedoch wieder an (Abbildung 23).

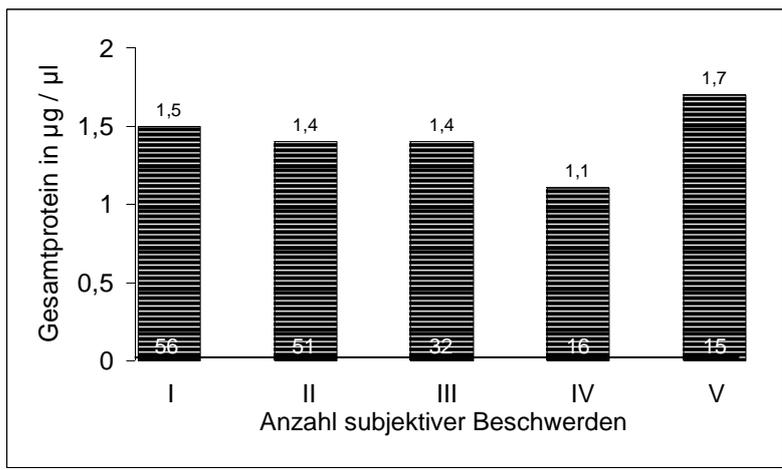


Abbildung 23: Graphische Analyse der Proteinkonzentration (µg / µl) in Tränenflüssigkeit bei Probanden mit Trockenem Auge (n = 170) in Bezug zur Anzahl an Symptomen (I - V). Die Anzahl an Probanden der jeweiligen Symptom - Untergruppe ist am Diagrammboden angegeben und die daraus ermittelte Durchschnittskonzentration an Protein steht über dem Diagramm.

Ein Mikroliter von Tränen der 56 Probanden mit einem Symptom enthält im Mittel 1,5 µg Protein. Bei Probanden mit zwei (n = 51) und drei (n = 32) Symptomen fällt der Proteingehalt auf durchschnittlich 1,4 µg / µl, bei den 16 Personen mit vier Symptomen auf 1,1 µg / µl ab. Interessanterweise steigt die Proteinkonzentration der 15 Probanden mit fünf Symptomen auf durchschnittlich 1,7 µg / µl an.

3.3.2 ELISA - Auswertung zur Beurteilung der Rolle des okulären - Surfactant - Systems in der Pathogenese des Trockenen Auges

Viele Erkrankungen der Augenoberfläche, wie etwa das Trockene Auge, lassen sich auf eine veränderte Proteinkonzentration im betroffenen Gewebe und / oder in der Tränenflüssigkeit zurückführen. Durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wird die Annahme gestützt, dass die Surfactant - Proteine unter bestimmten pathologischen Einflüssen (z.B. Bakterien) oder unter Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen an der Augenoberfläche und im Tränenapparat induziert und / oder reguliert werden. Die mittels Schirmer - Streifen gesammelten Tränenproben von 306 Probanden wurden dafür ELISA - Analysen (2.7) unterzogen, um Aufschluss über deren Konzentration an Surfactant - Proteinen in Bezug zur Gesamtkonzentration an Protein zu erhalten und deren vermuteten Zusammenhang zum Trockenen Auge aufzuklären.

Die beiden hydrophilen Proteine SP - A und - D stehen als Vertreter der Kollektin - Familie des C - Typs im Dienste immunologischer Funktionen. Beide Proteine zeigen mittels ELISA - Auswertung in Tränen von Probanden mit Trockenen Augen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe. So beläuft sich der Gehalt an SP - A in Tränen von Probanden mit Trockenen Augen (n = 25) im Mittel auf 8 ng pro mg Gesamtprotein, und liegt somit um 168 % signifikant ($p < 0,05$) höher als in der diesbezüglich gesunden Vergleichsgruppe (n = 25) mit 3 ng / mg.

Eine vergleichbare Tendenz zeigt auch SP - D. Hier steigt die Konzentration ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) um 147 % auf 35 ng / mg bei Betroffenen mit Trockenen Augen (n = 25) an. Die mit 22 Personen besetzte Vergleichsgruppe enthielt in ihrer Tränenflüssigkeit im Mittel 14 ng / mg (Abbildung 24, 25).

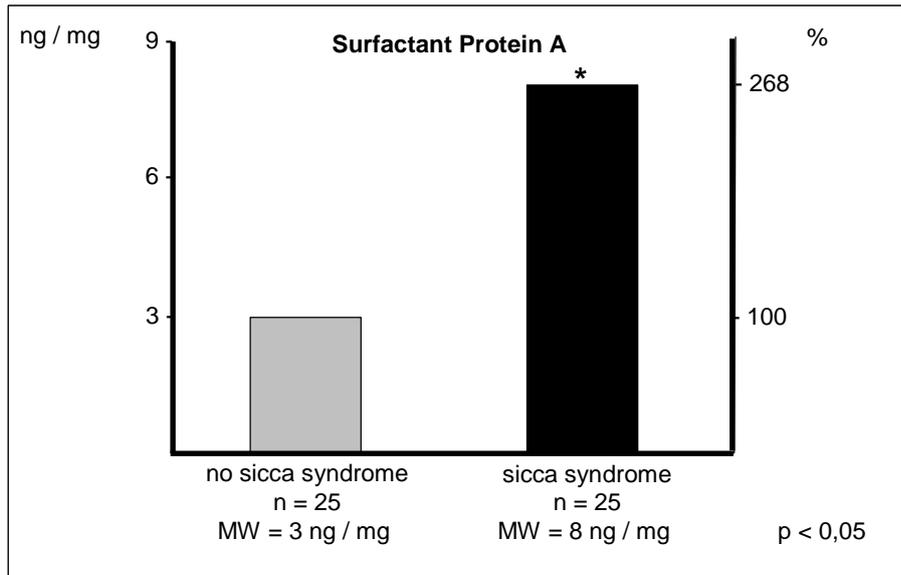


Abbildung 24: Quantifizierung der SP - A - Konzentration in Tränen von Probanden ohne (no sicca) und mit Trockenem Augen (sicca). MW = Mittelwert aus den einzelnen Messwerten der jeweiligen Gruppe (n = Anzahl). Linksskaliert: ng SP - A pro mg Gesamtprotein (ng / mg), Rechtsskaliert: Relation zur gesunden Vergleichsgruppe (%). * = Signifikanz nach Konvention mit einem p - Value <math>< 0,05</math>.

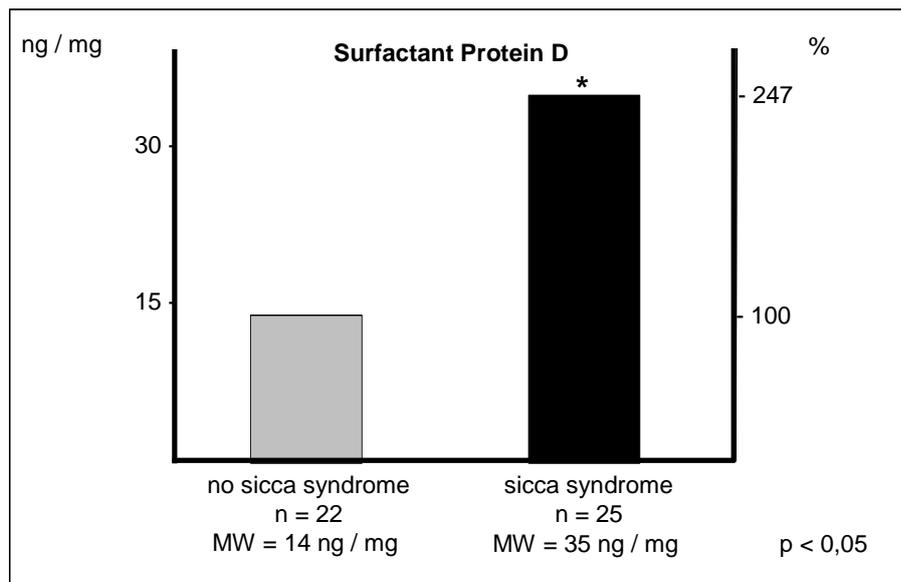


Abbildung 25: Quantifizierung der SP - D - Konzentration in Tränen von Probanden ohne (no sicca) und mit Trockenem Augen (sicca). MW = Mittelwert aus den einzelnen Messwerten der jeweiligen Gruppe (n = Anzahl). Linksskaliert: ng SP - D pro mg Gesamtprotein (ng / mg), Rechtsskaliert: Relation zur gesunden Vergleichsgruppe (%). * = Signifikanz nach Konvention mit einem p - Value <math>< 0,05</math>.

Die oberflächenaktiven und lipophilen Surfactant - Proteine SP - B und SP - C liefern ein vergleichbares Bild eines Konzentrationsanstieges in Tränenflüssigkeit, wenn Probanden von der Symptomatik eines Trockenem Auges berichten.

So spendeten 37 Personen mit einem Trockenen Auge Tränenflüssigkeit, in der SP - B mit 189 ng / mg Gesamtprotein um 11 % höher konzentriert ist, als in der gleichgroßen gesunden Vergleichsgruppe (n = 37) mit 170 ng / mg ($p > 0,05$). SP - C steigt signifikant ($p < 0,05$) um 43 % von 5 ng / mg bei gesunden (n = 32) auf durchschnittlich 8 ng / mg bei Betroffenen (n = 38) (Abbildung 26, 27).

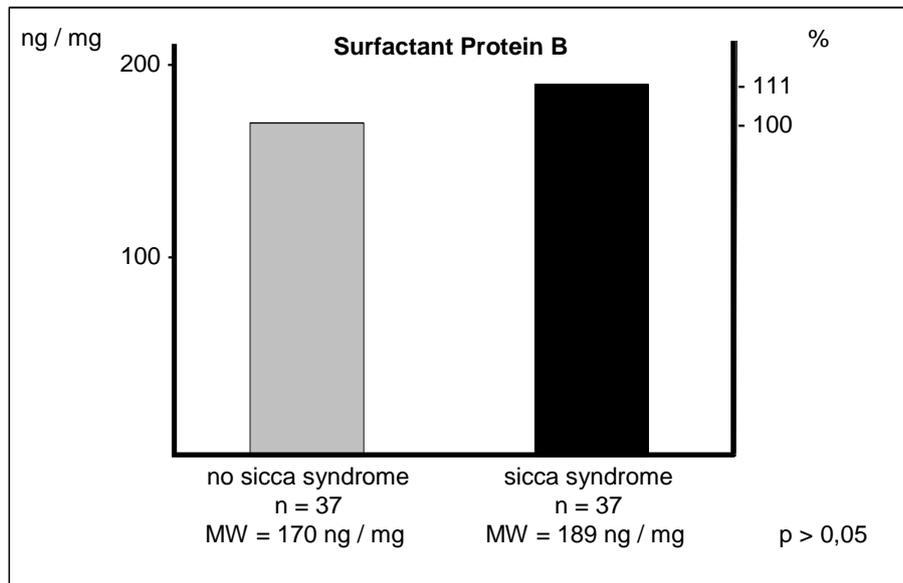


Abbildung 26: Quantifizierung der SP - B - Konzentration in Tränen von Probanden ohne (no sicca) und mit Trockenen Augen (sicca). MW = Mittelwert aus den einzelnen Messwerten der jeweiligen Gruppe (n = Anzahl). Linksskaliert: ng SP - B pro mg Gesamtprotein (ng / mg), Rechtsskaliert: Relation zur gesunden Vergleichsgruppe (%). * = Signifikanz nach Konvention mit einem p - Value $< 0,05$.

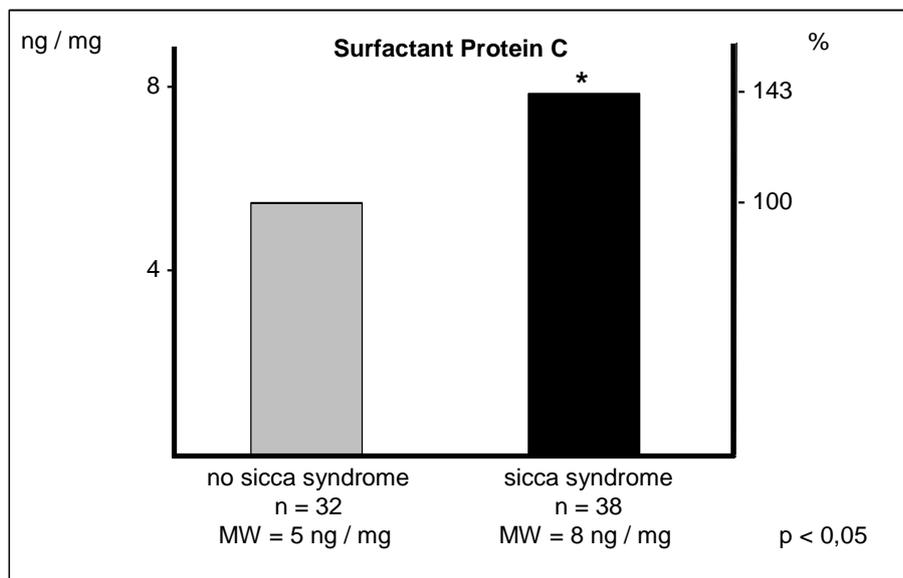


Abbildung 27: Quantifizierung der SP - C - Konzentration in Tränen von Probanden ohne (no sicca) und mit Trockenen Augen (sicca). MW = Mittelwert aus den einzelnen Messwerten der jeweiligen Gruppe (n = Anzahl). Linksskaliert: ng SP - C pro mg Gesamtprotein (ng / mg), Rechtsskaliert: Relation zur gesunden Vergleichsgruppe (%). * = Signifikanz nach Konvention mit einem p - Value $< 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Nachweis der Surfactant - Proteine A, B, C und D in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit

Der von Bräuer et al. (2007) erbrachte Nachweis aller bisher bekannten Surfactant - Proteine im humanen - okulären - Milieu [168, 169] konnte übereinstimmend in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In Tränendrüse und Tränenflüssigkeit konnten die Surfactant - Proteine SP - A, - B, - C und - D durch Western - Blot - Analysen bei ihrem spezifischen Molekulargewicht eindeutig detektiert werden. Daher konnten Aussagen einiger Autoren über eine diesbezügliche Nichtexistenz revidiert werden [166]. Überträgt man die von den Surfactant - Proteinen vor allem für die Lunge beschriebenen Eigenschaften (SP - A, SP - D: u.a. immunologische Funktion / SP - B, SP - C: u.a. Oberflächenaktivität) auf die Gewebe der Augenoberfläche und des Tränensystems, kommt diesen im Hinblick auf die Funktionalität und Stabilität des Tränenfilms eine immense Bedeutung zu. Erste Untersuchungen belegen diese Annahmen [168, 169]. Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen sind schon seit längerem antimikrobielle Substanzen im Tränenfilm bekannt, die von verschiedenen Strukturen des Tränenapparates und der Augenoberfläche synthetisiert werden [2 - 4]. So könnten Abweichungen und Störungen im okulären - Surfactant - System zu erheblichen Beeinträchtigungen der komplexen Abwehr- und Schutzmechanismen des Augen- und Tränenapparates führen und u.a. einen potentiellen Auslöser für das Trockene Auge darstellen.

4.2 Kapillare und Schirmer - Streifen: Verfahren zur Gewinnung von Tränen lebender Probanden und zur Erforschung der darin enthaltenen Proteine

In der Fachwelt ist man sich bis heute uneins, welche Methode zur nicht invasiven Entnahme von Tränenflüssigkeit für Untersuchungszwecke besser geeignet ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden favorisierten Verfahren, die Kapillare und der Schirmer - Streifen, vergleichend betrachtet. Einbezogen wurden dafür die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford (2.3) sowie die Anfärbung von Proteinbanden im Gel (Coomassie, Silber) und auf der Membran (Ponceau) (2.6) im Rahmen von Western - Blot - Analysen zur Untersuchung von lipo-, als auch hydrophilen Surfactant - Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts (2.5).

Es zeigte sich, dass mit beiden Verfahren ausreichende Mengen an Tränen generiert und in der so gewonnen Tränenflüssigkeit Proteine unterschiedlicher Größe und physikochemischer Eigenschaften molekularbiologisch untersucht werden können.

Es sei darauf hingewiesen, dass sich außer den hydrophilen Proteinen SP - A und - D, auch die wasserunlöslichen, hydrophoben Surfactant - Proteine B und - C von der Augenoberfläche mit beiden Verfahren aufnehmen und nachweisen ließen. Dabei zeigten im Western - Blot alle vier untersuchten Surfactant - Proteine in Kapillar - Tränen eine intensivere Bandenzeichnung als Schirmer - Tränen. Zudem zeigen Tränen aus der Kapillare mit 4,8 µg Gesamtprotein pro µl Tränenflüssigkeit im Vergleich zu 4,6 µg / µl aus Schirmer - Tränen einen etwas höhere Gehalt an Gesamtprotein. Diese Befunde könnten darauf basieren, dass die mittels Schirmer - Streifen aufgesogenen Tränen, anders als die reine Tränenflüssigkeit der Kapillare, erst aus dem Streifen heraus zentrifugiert werden müssen, was zu minimalen Rückständen an Proteinen im Fließpapier des Schirmer - Streifens führen könnte, da ein vollständiger Rückgewinn der kompletten Tränenflüssigkeit vermutlich nicht möglich ist. Obwohl das Probenmaterial zur selben Tageszeit und von der gleichen Person abgeerntet wurde, könnten auch physiologische Schwankungen in der Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit des Probanden etwa durch psychogene und / oder sensorische Reize zu diesen aufgezeigten Differenzen geführt haben, was andere Studien untermauern [203]. Da der Schirmer - Streifen durch seinen direkten Kontakt mit der Augenoberfläche mitunter zu einer verstärkten Reflexsekretion führt, könnten die so gewonnenen Reflex - Tränen im wässrigen Anteil erhöht, aber im Proteingehalt vermindert sein.

Somit war die Grundlage geschaffen, Tränenflüssigkeit quantitativ und qualitativ nicht invasiv von lebenden Probanden zu gewinnen, um physiologische Prozesse in der Tränenflüssigkeit und auf der Augenoberfläche zu analysieren und Tränen von gesunden und erkrankten Personen vergleichend molekularbiologisch zu untersuchen.

4.3 Einflussfaktoren auf die Pathogenese des Trockenen Auges

Bei der Auswertung anamnestisch erhobener Patienten - Daten sollte berücksichtigt werden, dass dies Informationen sind, die der Patient aus seinem Gedächtnis rekapituliert. Unabhängig vom Alter und Geschlecht konnten viele Patienten jedoch bei genauerer Differenzierung nicht angeben, welche Erkrankung bei ihnen genau diagnostiziert wurde. So wurde von Herz - Kreislauf - Erkrankungen berichtet, wobei nicht gesagt werden konnte, ob es sich um hyper- oder hypotense Beschwerden, brady- oder tachykarde Herzrhythmusstörungen, etc. handelt. Ebenso konnte die Mehrzahl der Befragten keine adäquate Auskunft über die eingenommene Medikation machen. Häufig wurde lediglich geäußert, sie würden etwas für irgendeine Erkrankung einnehmen. Weder Indikation, Präparatname oder Dosis konnte von der Mehrzahl der Teilnehmer verifiziert werden.

So konnte einigen Aspekten der Befragung nur oberflächlich nachgegangen werden. Da zudem im kontrollierenden Vergleich von Patientenaussage und Dokumentation zum Teil erhebliche Defizite auftraten, ist die alleineinige Befragung von Personen bezüglich ihrer Korrektheit eher fragwürdig bzw. nicht immer vollständig und die Zuhilfenahme der medizinischen Dokumentation sollte daher immer erfolgen.

Die vorliegende Arbeit ist der Hauptaufgabe gewidmet, die Rolle der Surfactant - Proteine im Rahmen der Pathogenese des Trockenen Auges zu klären. Für Fragestellungen assoziierter Begleiterkrankungen und weiteren Einflussfaktoren ist die Population von 306 Probanden doch eher gering. Viele Erkrankungen die im Zusammenhang mit einem Trockenen Auge stehen könnten, kommen in der Bevölkerung zum Teil recht selten vor, was die Aussagekraft einiger erhobener Ergebnisse bzw. die Überprüfbarkeit der in der Literatur gelegentlich gegensätzlich belegten Befunde schmälert. Die Fallzahlen waren bei gezielten, nach einzelnen Erkrankungen separierten, Fragestellungen zum Teil sehr gering, was eine Zusammenfassung in zahlenmäßig größere Obergruppen nötig machte, mit den Folgen einer eher allgemein, oberflächlichen Aussagekraft. Verzerrend kommt hinzu, dass mit zunehmendem Alter auch unterschiedliche Erkrankungen vermehrt auftreten. Somit können zwar Komorbiditäten zum Trockenen Auge aufgezeigt werden, die eigentliche Ursache liegt jedoch im zunehmenden Alter begründet. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein Trockenes Auge ähnliche Ursachen hat wie andere Erkrankungen. Dies kann dazu führen, dass eine Ursache mehrere Erkrankungen auslösen kann, ohne dass diese im direkten ätiologischen Zusammenhang zueinander stehen. So können die erbrachten Daten zwar richtungweisend als Orientierung dienen, weiterführende Untersuchungen müssen aber deren jeweilige Aussagekraft, in separaten Studien mit einer angepassten Fallzahl und genauerer Differenzierung der einzelnen Untergruppen, festigen.

4.3.1 Alter und Geschlecht

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich im Rahmen eines Trockenen Auges bisher bekannte, aber auch neue interessante Aspekte in dessen Pathogenese. Mit 56 % zählt das Trockene Auge, wie bereits in der Literatur beschrieben [20], zu einer der häufigsten Diagnosen beim Augenarzt. Viele Studien verweisen auf die Rolle des weiblichen Geschlechts und das Alter bei der Entstehung eines Trockenen Auges [24, 25], was durch eigene Betrachtungen bestätigt werden kann. In Anlehnung an bereits durchgeführten Studien [14], wurde die Trennung der Probandenpopulation bei 40 Jahren vorgenommen. Somit entstanden zwei Gruppen. Eine Gruppe jünger als 40 Jahre (< 40 Jahre) und eine Gruppe aus Vierzigjährigen und älteren Personen (\geq 40 Jahre).

So waren 89 % der Probanden mit einem Trockenen Auge 40 Jahre und älter und 59 % der Betroffenen weiblichen Geschlechts. Dies deckt sich mit Aussagen aus der Kanadischen - Studie mit 60 % oder auch der Malmö - Studie mit 59 % anteilig betroffenen Frauen [20]. In der diesbezüglich gesunden Vergleichsgruppe waren 68 % 40 Jahre und älter sowie 54 % Frauen. Im Schnitt waren Betroffene mit Trockenen Auge 60 Jahre alt und somit 10 Jahre älter als diesbezüglich gesunde Personen. Ladwig et al. (2000) wiesen jedoch darauf hin, dass die Bereitschaft zur Symptombereichterstattung bei Frauen höher ausfällt als bei Männern [26], was ebenfalls festgestellt werden konnte. 57 % der beim Augenarzt vorstelligen Personen waren Frauen. Sowohl unter den Gesunden als auch bei Betroffenen mit Trockenen Augen waren Frauen immer häufiger vertreten.

Dies ist eventuell auch die Begründung für das Ergebnis, dass betroffene Männer im Schnitt vier Jahre älter waren als betroffene Frauen (62 vs. 58 Jahre) und sie erst ab der 5. Lebensdekade, und damit 10 Jahre später als Frauen, vermehrt Beschwerden eines Trockenen Auges schilderten, mit steigender Tendenz bis zur 7. Lebensdekade. Betrachtenswert ist ebenfalls das Ergebnis des Schirmer - I - Tests in der gesunden Vergleichsgruppe. Hier zeigten Männer, obwohl sie keine Beschwerden eines Trockenen Auges angaben, eine Reduktion der gespendeten Tränenmenge um 16 % im Vergleich zum ebenfalls nicht betroffenen weiblichen Ponton (51 vs. 43 mm). Zudem leiden Männer scheinbar häufiger unter mehr als einem Symptom eines Trockenen Auges als Frauen (71 % vs. 61 %). Höchst wahrscheinlich treten die Beschwerden bei Frauen nicht eher und auch nicht schwächer, sondern bei beiden Geschlechtern gleichzeitig und gleich stark auf, Männer gehen aber erst ab einem gewissen Beschwerdegrad und damit später zum Arzt, obwohl die Tränensekretion bereits vermindert ist. Diese Vermutung kann durch Arbeiten von Murube et al. (2008) [206] gestützt werden, wo es keine Trennung zwischen den Geschlechtern gibt, sondern allgemein von einem Rückgang der Tränenproduktion ab dem 30. Lebensjahr gesprochen wird, mit dem Erreichen einer kritischen Grenze in der 4. Lebensdekade. Übereinstimmend mit dieser Veröffentlichung zeigte sich in eigenen Betrachtungen, dass ab dem 30. Lebensjahr mit zunehmendem Alter der prozentuale Anteil an Betroffenen in der jeweiligen Altersgruppe, unabhängig vom Geschlecht, deutlich auf 50 % und höher anstieg, mit einem Gipfel in der 7. Lebensdekade, wo 72 % der entsprechenden Altersgruppe ein Trockenes Auge beklagten. Dies stützt die Aussage der Mehrzahl an Publikationen, die neben einer verringerten Androgenkonzentration [41], eine Reihe von physiologischen und pathologischen Veränderungen im Alter, mit Einfluss auf das Auge, festgestellt haben [46 - 50].

Allerdings ist es äußerst schwierig gesunde ältere Personen zu finden die nicht zusätzlich an anderen Erkrankungen leiden, welche die Aussage über den reinen Alterseinfluss verzerren [49].

4.3.3 Atemwegserkrankungen

Erkrankungen der Atemwege treten zwar in ihrer Gesamtheit häufiger bei Probanden mit Trockenen Augen auf, in der separaten Aufschlüsselung lässt sich dies für die einzelnen Krankheitsbilder, die ebenfalls vermehrt im höheren Alter vorkommen (chronische Bronchitis, Lungenkrebs), allerdings nicht belegen. In der Literatur lassen sich diesbezüglich ebenfalls keine Hinweise finden, und so scheint es im Alter vermehrt zu Erkrankungen der Atemwege zu kommen, ohne im direkten Zusammenhang mit einem Trockenen Auge zu stehen. Es sei aber bemerkt, dass außer den sekundären Lymphorganen auf Schleimhäuten sowohl im Respirationssystem als auch auf der Augenoberfläche mukosa - assoziiertes - lymphatisches - Gewebe existiert (MALT). Dieses dient als Außenstelle des Immunsystems mit der Möglichkeit einer Toleranzentwicklung gegenüber einer physiologischen Mikroorganismen - Flora. Auf der Augenoberfläche findet man diese passive und aktive Immunabwehr in Form des konjunktiva - assoziierten - lymphatischen - Gewebes (CALT). Dies kann zu der Annahme führen, dass sich Störungen in der Immunabwehr sowohl am Auge, als auch in den Atemwegen zusammenhängend auswirken können. Nach Antigenexpositionen in anderen MALT - Regionen könnten Gedächtniszellen des Immunsystems in konjunktivales Gewebe wandern und dort nach Antigenkontakt eine Sekundärantwort auslösen.

4.3.3 Irritative Einflüsse auf das Auge

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von irritativen Ereignissen auf das Auge und das Entstehen eines Trockenen Auges, wie bereits in der Literatur diskutiert, zum Teil bestätigt werden. So führten Bildschirmarbeit [75, 76], chronische Entzündungen [116 - 126] und Klimaanlage [77] vermehrt zu einem Trockenen Auge. Die diesbezüglichen Vorstellungen zum Pathomechanismus wurden in der Einleitung erörtert. Obwohl in vielen Studien belegt, konnte in der vorliegenden Arbeit der negative Einfluss von Kontaktlinsen [99 - 106], Kosmetika [78], Operationen bzw. Verletzungen am Auge [80 - 88], Zigarettenrauch oder anderen chemischen Irritatoren [71, 72] für das Entstehen eines Trockenen Auges nicht bestätigt werden.

4.3.4 Gynäkologische Erkrankungen - Myom

Interessant ist die noch nicht beschriebene Tatsache eines vermehrten Auftretens von Myomen und den darauf häufig folgenden Hysterektomien bei Probandinnen mit Trockenen Augen. Neben einer hereditären Veranlagung scheint eine Östrogenüberproduktion zu einem Uterus myomatosus zu führen. Da die Einnahme von Ovulationshemmern über einen Zeitraum von 10 Jahren das Risiko für ein Myom um 30 % reduziert. Dies ergänzt Studien bezüglich einer gesteigerten Östrogenkonzentration als Ursache für ein Trockenes Auge [37 - 39, 45].

4.3.5 Hauterkrankungen - Trockene Haut

Der erbrachte Nachweis vom Zusammenhang zwischen Trockenen Augen und Hauterkrankungen, im speziellen einer trockenen Haut, unterstreicht bisherige Veröffentlichungen [60]. Eigene Arbeiten verdeutlichen die Rolle des Y+ - Transporters in Epithelzellen von Haut und Augenoberfläche. Dieser Komplex aus CAT - Proteinen (Cationic - Amino - Acid - Transporter) dient dem Transport von L - Arginin, L - Lysin und L - Ornithin als Voraussetzung zur Expression von beta - Defensinen als protektiv wirkende antimikrobielle Peptide bei entzündlichen Prozessen. Störungen in diesem Transportsystem könnten zu Veränderungen an Haut und Augenoberfläche und so zu trockener Haut und / oder einem Trockenen Auge führen [207]. Zudem liegen zwischen Haut und Auge Schnittpunkte in der Embryogenese vor, was eine Gemeinsamkeit bei pathologischen Prozessen erklärt.

4.3.6 Herz - Kreislauf - Erkrankungen

Die Signifikanz von Hypertonus und Herzrhythmusstörungen zu Trockenen Augen lässt sich am ehesten auf das gehäufte Auftreten mit steigendem Lebensalter zurückführen. Rein pathophysiologisch scheint ein Zusammenhang nicht vorzuliegen. Jedoch können die zur Therapie dieser Krankheitsbilder eingesetzten Medikamente ein Trockenes Auge begünstigen [14]. Dies kann jedoch aufgrund der unvollständigen Angaben der Probanden bezüglich genauer Diagnose und Therapie nicht näher erörtert werden. Interessanterweise leiden Personen unter Trockenen Augen, die ihren Hypertonus mit Medikamenten behandeln. Personen ohne Medikamenteneinnahme haben zwar einen Hypertonus, eine Signifikanz zum Trockenen Auge besteht aber nicht. Was den Blick eher in Richtung Medikation, als auf den Hypertonus an sich als Ursache für ein Trockenes Auge richten lässt.

Es sei jedoch erwähnt, dass die Tränensekretion einer gezielten neuronalen Steuerung unterliegt. Es konnten sympathische und parasympathische Nervenfasern im Tränensystem [208], sowie diverse Neurotransmitter (Adrenalin, Acetylcholin, Calcitonin - Gene-related - Peptid, Neuropeptid Y, Substanz P, Vasoaktive - intestinale - Polypeptid (VIP)) nachgewiesen werden [209], deren okulären Regelkreisläufe sind jedoch noch nicht ganz verstanden und mögliche Schlussfolgerungen auf das Herz - Kreislauf - System daher nicht möglich.

4.3.7 Erkrankungen des Verdauungssystems

Bei den Krankheitsbildern der Fettleber und dem Trockenen Auge gibt es einige interessante Schnittstellen, was den beobachteten signifikanten Zusammenhang erklären könnte. Für beide Pathologien sind die gleichen Ätiologien beschrieben. So etwa der Typ - II - Diabetes [58, 59], medikamentös - toxische Reaktionen [14, 20], Proteinmangelernährung und Malabsorption [65] sowie Störungen im Fettsäurestoffwechsel [62]. Da es bei 80 % der Betroffenen mit Trockenen Augen zu Störungen in der Lipidphase des Tränenfilms kommt [19], kann ein Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. Durch ihre Detergenzwirkung können freie Fettsäuren über eine verstärkte Lipidperoxidation zu Zellmembranschäden führen [210].

Der erbrachte signifikante Zusammenhang zwischen Erkrankungen des Magen - Darm - Trakts und einem Trockenen Auge könnte hypothetisch folgendermaßen begründet sein: das Sekret der Tränendrüse gelangt nachweislich über die ableitenden Tränenwege über die Nase bis in den Darm. Hier erfolgt über humorale bzw. immunologische Rückkopplungsmechanismen dessen Rückresorption. Daher könnten Beeinträchtigungen im Magen - Darm - Trakt den Tränen - Regelkreislauf beeinflussen und so ein Trockenes Auge begünstigen. Zudem können Erkrankungen des Gastro - Intestinal - Traktes zur Mangel- bzw. Fehlernährung und so zu einem Trockenen Auge führen [47 - 50]. Der direkte Zusammenhang zwischen Appendizitis und Trockenen Augen scheint auf den ersten Blick die erbrachte Signifikanz nicht zu rechtfertigen. Interessanterweise kann die Diagnose einer Appendizitis vor allem bei jüngeren Personen nicht selten eine Fehleinschätzung sein und in Wahrheit einen Morbus Crohn verschleiern, dessen extraintestinaler Verlauf eine Konjunktivitis beinhalten kann. Dies konnte aber in dieser Arbeit nicht näher bestimmt werden. Wie oben erwähnt, steht das konjunktiva - assoziierte - lymphatische - Gewebe (CALT) mit anderen lymphatischen Geweben in Verbindung, wie etwa in den Bronchien (BALT) oder im Gastro - Intestinal - Trakt (GALT).

So könnten eine Erregerexposition u.a. beeinflussende Faktoren an diesen Geweben eine lokale, aber auch eine systemisch zirkulierende und übergreifende Immunantwort mit Bildung spezifischer Antikörper auf andere Gewebe auslösen. Dabei können B- und T - Lymphozyten gezielt über hochendotheliale Venolen (HEV) am Gefäßendothel, Adhäsionsmoleküle auf Abwehrzellen und Zytokine (TNF - alpha, IFN - gamma, IL - 1, IL - 8) in periphere Gewebe gelenkt werden. Über diesen Zusammenhang könnten sich Veränderungen im lymphatischen System auf Auge und Appendix auswirken [20].

Da das Ulcus ventriculi mit einem Altersgipfel von 60 - 65 Jahren, wie auch das Trockene Auge, eine Erkrankung des reiferen Lebensabschnittes ist, könnte dies eine Ursache für deren signifikanten Zusammenhang darstellen. Die Ursache für ein Ulcus-leiden ist in den meisten Fällen durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* begründet, wo es über entzündliche Zellinfiltrate durch Zytokinfreisetzung zur Reduktion der Somatostatinproduktion kommt. Ein Zusammenhang zum Trockenen Auge ist aber bisher rein spekulativ. Jedoch könnten in diesem Zusammenhang Prostaglandine eine interessante Rolle spielen. Im Magen fördern die Prostaglandine PGE 2 und PGI 2 die Bicarbonatsekretion aus mukösen Zellen und dienen so als Säurepuffer in der Mukusschicht dem Schutz der Magenschleimhaut. Für die Benetzbarkeit und Integrität der Augenoberfläche spielen Glykoproteine eine wichtige Rolle. Sie werden von Becher- und Oberflächenepithelzellen gebildet und befinden sich als Protein - Muzin - Komplexe in der Muzinphase des Tränenfilms. Bei der Regulation der Sekretion dieser Glykoproteine scheinen ebenfalls Prostaglandine nötig zu sein [20]. Zudem haben auch einige Medikamente einen negativen Einfluss auf die Synthese von Prostaglandinen als Schutzelement für Magen und möglicherweise auch Augen.

Im Vergleich von Gallensteinleiden in Kombination mit der Entfernung der Gallenblase zum Trockenen Auge zeigen sich eine Reihe von gleichen Risikofaktoren, wie etwa das Alter [24, 25], gesteigerte Östrogenkonzentration bzw. Frauen vor der Menopause [14, 30, 45] oder Typ - II - Diabetes [58, 59], was ein gleichzeitiges Auftreten beider Erkrankungen begünstigt.

4.3.8 Osteoporose

Bei dem erbrachten Zusammenhang zwischen Osteoporose und Trockenen Augen finden sich ähnliche Ursachen als Auslöser beider Krankheitsbilder. So führen unterschiedlichste Faktoren zur Abnahme der Knochenmasse wie auch zum Entstehen eines Trockenen Auges, so etwa Depression [23, 31], Fehlernährung [65], Entzündungszytokine mit osteolytischen Eigenschaften (IL - 1) [118], chronische Entzündungen (rheumatoide Arthritis) [51] oder Zytostatikatherapie [14].

4.3.9 Depression

Die in der Literatur erbrachte Korrelation zwischen Depression und einem Trockenen Auge [23, 31] konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erbracht werden. Ob die Ursache in einer verringerten Blinzelrate [31 - 34] oder in einer antidepressiven Therapie [14, 20] zu finden ist, kann hier nicht geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen in der Psychoneuroimmunoendokrinologie.

4.3.10 Erkrankungen der Schilddrüse

Zwar litten Probanden mit Trockenen Augen signifikant häufiger an Erkrankungen der Schilddrüse, bei genauer Betrachtung einzelner Schilddrüsenerkrankungsbilder konnte dies jedoch nicht konkretisiert werden. Dies liegt zum Teil an den unvollständigen anamnestischen Angaben. Zwar wussten die Betroffenen von einer möglichen Erkrankung ihrer Schilddrüse, ob es sich aber um eine z.B. Über- oder Unterfunktion handelte konnte nicht verbalisiert werden. Einige Aspekte bezüglich einer Korrelation wären zwar nachvollziehbar, bleiben aber unter gegebenen Umständen reine Spekulation.

So könnten etwa die Schädigung von Drüsengewebe durch die Autoimmunthyreoiditis vom Typ Hashimoto [51] oder ein negativer Einfluss auf die Augenoberfläche im Rahmen eines endokrinen Exophthalmus [36] ein Trockenes Auge begünstigen.

4.3.11 Stoffwechselerkrankungen

Interessanterweise zeigt unter den Stoffwechselerkrankungen der Diabetes mellitus Typ II in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation mit einem Trockenen Auge, was bisher in vielen Studien anders bewertet wurde [58, 59]. Jedoch zeigten Hyperlipidämie und Gicht einen signifikanten Anstieg unter Personen mit Trockenen Augen, bei denen zu 80 % die Lipidphase des Tränenfilms gestört ist, die aus Cholesterin, Triglyceriden, Cholesterinestern und Phospholipiden aufgebaut wird [19]. Leider konnten auch hier die Betroffenen nur überschriftsmäßig ihre Erkrankung benennen, was mögliche Zusammenhänge nur vermuten lässt. So kommt es bei der primären Hyperlipoproteinämie genetisch bedingt zu Störungen in der Lipoprotein - Homöostase aufgrund von u.a. Rezeptor - Gen - Defekten mit Folgen einer vermehrten Biosynthese von Cholesterin oder auch Triglyceriden. So könnten diese Störungen auch auf den Lipidumsatz an der Augenoberfläche Einfluss nehmen und so zu einem Trockenen Auge führen. Die in der vorliegenden Arbeit erbrachte signifikante Korrelation zwischen Gicht und Trockenen Augen ist in der Literatur bisher noch nicht direkt beschrieben.

Indirekt lassen sich jedoch auch hier ursächliche Parallelen finden. Neben einer genetisch disponierten primären Hyperurikämie führen diverse Ursachen sowohl zu einer sekundären Hyperurikämie als auch zu einem Trockenen Auge. So etwa im Allgemeinen ein höheres Lebensalter [24, 25], die Systemerkrankungen Psoriasis [208] und Sarkoidose [107] sowie Chemo- oder Radiotherapeutika [112]. Zudem können beide Erkrankungen medikamentös bedingt (Diuretika, Acetylsalicylsäure [14, 20]) oder durch einen Typ II Diabetes mellitus [58, 59] hervorgerufen werden. Differentialdiagnostisch zur Gicht kommt auch die rheumatoide Arthritis in Betracht, die über ihr destruktives Verhalten gegenüber Drüsengewebe ein Trockenes Auge begünstigen kann [51]. Bei der Gicht kommt es zu kristallinen Uratablagerungen in verschiedenen Geweben, was leukozytenvermittelt nach Kristallphagozytose zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zu einer akuten entzündlichen Reaktion führt. Obwohl Uratablagerungen in der Niere zum Untergang von Nierenparenchym führt, ist bisher noch nicht beschrieben, ob diese Vorgänge auch in Drüsengeweben stattfinden können, diese dadurch schädigen und so zu deren Hyposekretion führen. Über eine schädigende Wirkung von entzündlichen Prozessen auf Drüsengewebe und deren Gewichtung im Rahmen des Trockenen Auges berichteten bereits viele Autoren [55 - 57, 107 - 111].

4.3.12 Erkrankungen der Niere

Ebenfalls mit dem Alter nehmen Nierensteinleiden zu, was das vermehrte Auftreten bei Trockenen Augen erklären kann. Das erbrachte Ergebnis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen Trockenen Augen und vermehrten Erkrankungen der Niere kann aber auch bei der Betrachtung des Proteinhaushaltes interessant sein. In humanen Tränen kommt u.a. das Protein Albumin vor (Tränenspezifisches Präalbumin, Albumin, sowie Serumalbumin) mit einer vermuteten Funktion als Transportprotein für z.B. Retinolsäure, was der Differenzierung des Oberflächenepithels dient. Nierenerkrankungen mit vermehrter renaler Eiweißausscheidung (Proteinurie) können für eine Hypoalbuminämie und so am Auge für eine verminderte Epithelregeneration und / oder für eine Instabilität des präkornealen Tränenfilms verantwortlich sein [211].

4.3.13 Allergien

Obwohl in der Literatur sehr gut belegt, konnte in der vorliegenden Arbeit der Aspekt des allergisch bedingten Trockenen Auges [115] nicht signifikant bestätigt werden. Weder in der Gesamtheit aller Allergien noch bei der Betrachtung einzelner Allergie - Unterformen ist eine signifikante Korrelation feststellbar.

4.4 Symptomatisches Beschwerdebild beim Trockenen Auge

Bei der Erforschung des Trockenen Auges wird immer wieder deklariert, dass sich dieses Krankheitsbild hauptsächlich über symptomatische Beschwerden bemerkbar macht. Das führte dazu, dass dies auch so in der Definition dieser Erkrankung durch den DryEyeWorkShop - Report von 2007 festgehalten wurde [14]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Beschwerdeschilderungen von Betroffenen decken sich zum größten Teil mit Angaben aus der Literatur wie etwa der Melbourne - Studie von 1998 [14] (Trockenheit: 43 vs. 17 %, Überempfindlichkeit: 42 vs. 50 %, Tränen: 36 vs. 34 %, Schmerzen: 35 vs. 40 %, Fremdkörpergefühl: 32 vs. 26 %, Jucken: 31 % + Druckgefühl: 6 % vs. Mißempfindung: 32 %). Sowohl die vorliegenden, als auch Untersuchungen anderer Autoren zeigen dabei den multifaktoriellen Charakter der Erkrankung. Dabei kommt es in der Mehrzahl (65 %) zu Überschneidungen mehrerer Symptome, was u.a. den hohen subjektiven Leidensdruck der Betroffenen und die therapeutische Herausforderung erklärt [23, 130, 131].

4.5 Gespendete Tränenflüssigkeit im Schirmer - I - Test

Wie bereits in der Einleitung erläutert, gestaltet sich die Diagnostik des Trockenen Auges schwierig [14]. Trotz der in der Literatur beschriebenen Diskrepanzen wurde der in der Diagnostik angewandte Schirmer - Streifen genutzt, um nach der Schirmer - I - Methode zusätzliche Einblicke in das komplexe Krankheitsbild zu erhalten. Auch wenn alle Ergebnisse lediglich in zwei Kategorien (Trockenes Auge und gesund) unterteilt wurden und keine weitere Aufschlüsselung nach Schweregrad oder Unterformen des Trockenen Auges vorgenommen wurde, zeigt sich bei Betroffenen mit Trockenen Augen doch eine deutliche Reduktion in der aus beiden Augen gespendeten Tränenmenge um 23 % (von 47 auf 36 mm Laufstrecke). Diese Tendenz ist für beide Geschlechter nachweisbar, was das Postulat einer Hyposekretion in der Phase der Chronifizierung im Verlauf der Erkrankung unterstützt [126, 127].

Aus den beschriebenen Aspekten im Alterungsprozess [41, 46 - 48, 50] wird das Ergebnis einer Reduktion der Tränensekretion ab dem 40. Lebensjahr verständlich und konnte für jede Untergruppe, unabhängig vom Geschlecht oder Trockenen Augen, festgestellt werden. Dabei kommt es innerhalb jeder Gruppe zu erheblichen interindividuellen Schwankungen (Trockenes Auge: 5 - 86 mm; gesund: 10 - 104 mm), was bereits aus der Literatur bekannt ist [9, 14, 20, 134, 202 - 205]. Zudem führt das Reiben des Schirmer - Streifens auf der Augenoberfläche mitunter zu starken Schüben von Reflexsekretion.

So schließt sich die vorliegende Arbeit der Meinung von Eisner et al. [204] an, die dem Schirmer - Test lediglich eine „gute Orientierung“ zuschreibt. Wie aus der Literatur bekannt [203] zeigen sich auch in der vorliegenden Arbeit sowohl bei Gesunden, als auch bei an Trockenen Augen Erkrankten, Unterschiede in der Tränenspende zwischen den beiden Augen eines Individuums. Dabei lag bei 27 % der Betroffenen eine Seitendifferenz von mehr als 5 mm Laufstrecke zwischen den zwei Schirmer - Streifen vor. Interessant ist, dass symptomatisch gesunde Probanden häufiger (39 %) eine Seitendifferenz aufwiesen. Dies könnte die Aussage unterstützen, dass es asymptomatische Formen eines Trockenen Auges gibt, bzw. die Veränderungen an der Augenoberfläche noch zu gering bzw. einseitig sind, um von Betroffenen als symptomatische Beschwerden wahrgenommen zu werden. Diese asymptomatischen Personen fallen dann in die Kategorie des milden bzw. episodenhaften Trockenen Auges, das in der Statistik häufig untergeht und die Zahl der Betroffenen im Dunkeln und somit wahrscheinlich zu niedrig hält.

Auch die Abnahme der Oberflächensensibilität des Auges im Alter [20] kann zur Reduktion des subjektiven Empfindens und damit zu einer Verschleierung von Symptomen und somit zu falsch negativen Ergebnissen beitragen. Hierfür spricht auch, dass scheinbar Gesunde mit über 30 % ebenfalls, wie auch Betroffene, ihren Peak der Tränenspende im Bereich von 20 - 39 mm Laufstrecke im Schirmer - Streifen haben. Bis auf dieses Phänomen stützen die übrigen Ergebnisse die Pathophysiologie. So befinden sich unter Probanden, die weniger als 20 mm Tränen spendeten, doppelt so viele Erkrankte, sowie unter den, die mehr als 60 mm spendeten, deutlich mehr Gesunde. Allgemein spendeten Gesunde mehr Tränenflüssigkeit. So befinden sich vermutlich unter den scheinbar Gesunden bereits leichte Formen eines Trockenen Auges, die trotz fehlender Symptome gleich wenig Tränen besitzen.

4.6 Bestimmung des Gehaltes an Gesamtprotein in μg pro μl Tränenflüssigkeit

Die gesunde Tränenflüssigkeit beinhaltet etwa 500 verschiedene Proteine [13], die etwa 0,6 - 0,7 % des Tränen - Gesamtvolumen ausmachen, was etwa 6 - 20 μg / μl entspricht [20]. Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Werte befinden sich mit knapp 5 μg / μl etwas darunter. Diese Proteine sind das Sekretionsprodukt von Tränen-drüse, akzessorischen Krause- und Wolfring - Tränendrüsen, Molldrüsen, Oberflächen-epithel und oberflächlichem Gefäßsystem [211]. Die vielgestaltigen Funktionen dieser Proteine reichen dabei von spezifischer und unspezifischer Immunabwehr bis hin zur Regulation der Homöostase des Oberflächenepithels.

Im Rahmen eines Trockenen Auges konnte in Tränenflüssigkeit von Betroffenen eine Reduktion der Gesamtproteinkonzentration um rund 18 % (von 1,7 auf 1,4 µg / µl) nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit dem Verständnis, dass es bei Trockenen Augen u.a. zu einer Hyposekretion der Tränendrüse kommt (ADDE). Es folgt eine quantitative Abnahme der wässrigen Phase des Tränenfilms sowie eine qualitative Reduktion verschiedener Inhaltstoffe der Tränenflüssigkeit wie Immunglobulinen (v.a. Ig A), Laktoferrin, Lysozym oder auch diversen Wachstumsfaktoren (EGF) mit letztendlich einer generellen Abnahme der Gesamtproteinkonzentration. Einige Proteine sind dabei in ihrer Menge direkt von der wässrigen Tränensekretion abhängig [211].

Bei der evaporativen Form des Trockenen Auges (EDE) liegt eine gesteigerte Tränenverdunstungsrate vor. Hier ist quantitativ ausreichend, oft sogar kompensatorisch vermehrt Tränenflüssigkeit vorhanden, deren Zusammensetzung oder auch funktionelle Beeinträchtigungen in der regelrechten Tränenverteilung auf der Augenoberfläche kann aber eine adäquate Benetzung nicht gewährleisten. Hier können die, von der Tränensekretion unabhängigen, Proteine vermindert sein und trotz ausreichender Tränenmenge eine verminderte Gesamtproteinkonzentration hervorrufen. Eine Hyposekretion an Tränen, aber auch die vor allem für die Anfangsphase beschriebene kompensatorische Hypersekretion [124], fördern inflammatorische Prozesse [22], was über Entzündungszellen und deren Zytokine zu Entzündungen auf der Augenoberfläche führt [14, 117 - 120]. Dies wirkt okulär schädigend [125], mit den Folgen einer neuronalen Dysfunktion, eines Apoptosetods von Oberflächenepithelzellen mit Verlust von Microplacae, die der Adhärenz des Tränenfilms dienen [121], sowie einer Abnahme der Becherzellichte [122]. Da sowohl Becherzellen, als auch die Epithelzellen von Binde- und Hornhaut der Synthese von Proteinen und Muzinen dienen (u.a. MUC 5AC [104, 123]), führen diese Schädigungen u.a. zur Reduktion von Muzinen und der durch sie aufgebauten Oberflächenglykokalyx. Diese ist für den Aufbau sowie die Haftung des Tränenfilms wichtig, was nun negativ beeinflusst wird, mit Schäden in der Aufrechterhaltung der Tränenfilmstabilität, dem Anstieg der Oberflächenspannung und folglich dem Aufreißen des Tränenfilms. Dieser Verlust an Augenoberflächenmuzinen, die überwiegend Glykoproteine sind [116], sowie die bereits beschriebene verminderte Freisetzung von u.a. Substanz P und Expression von Wachstumsfaktoren [91, 92] spiegelt sich in der vorgebrachten Reduktion der Proteinkonzentration beim Trockenen Auge (um 18 %) wieder. Dieser verminderte Proteingehalt von u.a. Wachstumsfaktoren (EGF, FGF, NGF, PDGF), die für die Vermehrung der aus Stammzellen differenzierten Teilungszellen von Nöten sind oder auch von extrazellulären Matrixproteinen (wie Fibronectin, Laminin), von denen die Migration und Regeneration des Kornealepithels abhängig sind, können zu Defekten des okulären Oberflächenepithels führen [212].

Mit der Zunahme an symptomatischen Beschwerden eines Trockenen Auges sank die Gesamtproteinkonzentration in Tränenflüssigkeit von einem Symptom ($1,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) bis hin zu vier Symptomen ($1,1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) stetig um etwa 27 % ab, was als zunehmende Zellschädigung und einem Verlust an Proteinen mit der Zunahme an Beschwerden gedeutet werden kann. Interessanterweise steigt ab einem Beschwerdebild von fünf Symptomen die Proteinkonzentration wieder deutlich an. In Bezug zu einem Symptom um 14 % (von $1,5$ auf $1,7 \mu\text{g} / \mu\text{l}$) und zu vier Symptomen auf sogar 55 % (von $1,1$ auf $1,7 \mu\text{g} / \mu\text{l}$). Dies könnte verdeutlichen, dass sich unter einem Trockenen Auge erst später bzw. ab einem gewissen Beschwerdegrad entzündliche Komponenten entwickeln und so die Augenoberflächenentzündung mit gesteigerter Expression von Zytokinen nicht unbedingt ursächlich vorliegen muss, sondern sich im Laufe der Pathogenese als Reaktion auf ein gestörtes Oberflächenmilieu einstellt [55, 56]. Bei der in diesem Zusammenhang in der Fachwelt oft diskutierten Frage, ob ein Trockenes Auge ursächlich auf einer Degeneration oder einer Entzündung von Tränendrüsenewebe basiert [20], liefern die vorgebrachten Ergebnisse Aspekte einer primären Degeneration von Drüsenewebe (etwa im Alter) als Ursache für ein Trockenes Auge mit den Folgen eines okulären Entzündungsgeschehens. Jedoch beantworteten viele Studien diese Frage anders und belegen dies durch zahlreiche immunologisch medierte Erkrankungen als mögliche Ursache für ein Trockenes Auge [51 - 54]. Es scheint so, dass beide Varianten ursächlich existieren, sich gegenseitig begünstigen und fördern. Bei niedergradigen Verlaufsformen eines Trockenen Auges im höheren Lebensalter scheinen jedoch degenerative Veränderungen ursächlich zu überwiegen. Nach allgemeiner Lehrmeinung kommt es vor allem im Alter zu primär degenerativen Veränderung von Drüsenewebe mit Beeinträchtigung in der Sekretionsleistung. Es wurde gezeigt, dass mit zunehmendem Alter u.a. die Langerhans - Zelldichte konstant abnimmt [213]. Wie bereits erwähnt, sind viele Proteine in ihrer Menge direkt von dieser Sekretionsfunktionen abhängig, was in der vorliegenden Arbeit über die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration aufgezeigt werden konnte. Unabhängig, ob am Trockenen Auge erkrankt oder nicht, sowie vom Geschlecht zeigte sich mit zunehmendem Alter in jedem Gruppenvergleich eine Abnahme der Proteinkonzentration von 6 - 28 %. Durchschnittlich lässt sich sagen, dass Personen die 40 Jahre und älter waren, 17 % weniger Proteine in ihrer Tränenflüssigkeit aufwiesen, als Personen die jünger als 40 Jahre waren. Was die in der Literatur beschriebenen Funktionseinschränkungen von Drüsenewebe mit zunehmendem Alter untermauert [20, 41, 206].

Im Tierversuch an Affen konnte gezeigt werden, dass zudem neben dem zunehmenden Alter mechanische Irritationen der Konjunktiva zu einem Verlust an Becherzellen mit Reduktion an Glykoproteinen führen [14, 20].

Bei der Messung des Proteingehaltes zeigte sich, dass Männer weniger Proteine in ihren Tränen hatten, als Frauen aus derselben Untergruppe. So lag der Proteingehalt in Tränen von Männern mit Trockenen Augen etwa 7 % niedriger als bei betroffenen Frauen (1,5 vs. 1,4 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$). Gesunde Männertränen enthielten etwa 6 % weniger Protein als Tränen gesunder Frauen (1,8 vs. 1,7 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$). Dies könnte ebenfalls dem Umstand geschuldet sein, dass Männer erst später und / oder bei intensiveren Beschwerden und damit fortgeschrittener Erkrankung mit entsprechendem pathologischen Korrelat (einer Reduktion an Zellen und Proteinen) vorstellig werden. Es muss erwähnt werden, dass bei der Methode nach Bradford der Gehalt an Gesamtprotein gemessen wird. Die Bestimmung, welche der etwa 500 Proteine [13] genau betroffen sind, muss in zukünftigen Arbeiten mit differenzierteren Methoden geklärt werden. Bei den in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnissen sollte berücksichtigt werden, dass es sich, laut Definition nach dem Schirmer - I - Test [14] größtenteils um milde und leichte, selten um mittelschwere Formen eines Trockenen Auges handelte. 88 % der teilnehmenden Betroffenen spendeten nach 5 Min. 20 mm und mehr Tränenflüssigkeit aus beiden Augen, was dem Stadium I entspricht. Falls eine Therapie erforderlich war, erfolgte bei den Betroffenen lediglich die Anwendung von Tränenersatzmitteln, wobei auch hier von den Probanden leider nicht gesagt werden konnte, welche Präparate wie verwendet wurden. Dies hatte den Ausschluss dieses Betrachtungsaspektes aus den Untersuchungen zur Folge und somit konnte dem möglichen Einfluss topischer Augenmedikation [14] nicht nachgegangen werden. Es kann vermutet werden, dass bei höhergradigen Verlaufsformen, die vorgebrachten Ergebnisse noch deutlicher zu Tage treten, was weiterführenden und differenzierteren Studien zu untersuchen, vorbehalten bleibt.

4.7 Die Rolle der Surfactant - Proteine beim Trockenen Auge

4.7.1 Die hydrophilen Surfactant - Proteine SP - A und SP - D

SP - A und - D werden zusammen mit der wässrigen Komponente des Tränenfilms aus der Tränendrüse sezerniert und durch den Lidschlag gleichmäßig auf und / oder in den Epithelien der Augenoberfläche verteilt, wo sie ihre Aufgaben in der unspezifischen und sogar spezifischen Immunabwehr wahrnehmen und so zur Integrität einer immunologischen Barriere innerhalb der Tränenflüssigkeit beitragen.

So wird durch diverse Arbeiten angenommen, dass sich SP - A und - D als oligomerisierte Aggregate in der wässrigen Phase sowie am Übergang zur Lipidphase befinden. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass die Produktion beider Surfactant - Proteine im gesunden Gewebe induzierbar ist und / oder herauf reguliert wird. Dabei ist eine Ausbreitung vom Corneaepithel, durch das Stroma hindurch, bis zum Endothel möglich. Zudem zeigen beide Proteine bei diversen Pathologien veränderte Expressionsmuster [168]. Stimulationsversuche an Bindehaut- und Hornhaut - Epithelzelllinien mit bakteriellen Überständen und verschiedenen Zytokinen zeigen eine verstärkte Expression sowohl von SP - A als auch von SP - D [214]. Wobei für den immunpathologischen Prozess von SP - A und - D unterschiedliche Theorien diskutiert werden. So etwa der Einfluss verschiedener, modulierend wirkender Zytokine wie Interleukin 1 alpha, - 1 beta, Interferon gamma und Tumornekrosefaktor alpha. Die Sekretion von SP - A und SP - D stimuliert die Freisetzung von reaktiven, toxischen Sauerstoff- und Stickstoffradikalen durch Makrophagen, die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die Modulation der Funktion von T - Lymphozyten und dendritischen Zellen sowie die Aktivierung und Ankopplung von neutrophilen Granulozyten [176, 215]. SP - A fördert zudem die Phagozytose von *S. pneumoniae* über eine gesteigerte Expression des Scavenger - A - Rezeptors auf Zelloberflächen und verstärkt ebenso die Expression des Mannose - Rezeptors auf Makrophagen [216]. Die beiden hydrophilen Surfactant - Proteine lagern sich gezielt an Carbohydrate - recognition - domains bakterieller Zellwandbestandteile an, etwa Peptidoglykane oder Lipopolysaccharide, und sorgen so für deren Bindung, Agglutination, Immobilisierung und Opsonierung, was eine Erregerausbreitung beeinträchtigt. Ni et al. (2005) konnten bereits mit Hilfe von rekombinantem SP - D die Ausbreitung von *P. aeruginosa* im Corneaepithel eindämmen [217].

Für die Entstehung und den Verlauf von Erkrankungen der Augenoberfläche sind immunologisch regulierte entzündliche Komponenten von Bedeutung. Die entzündliche Komponente beim Trockenen Auge, sei es die Ursache oder eine Folge, ist in vielen Studien belegt und in der vorliegenden Arbeit bereits erwähnt worden. Die Augenoberfläche reagiert bei inflammatorischen Prozessen (z.B.: bei bakteriellen, viralen, fungi-formen Infektionen) mit einem Anstieg von unspezifischen Proteinen (Lysozym, Laktoferrin), Komplementfaktoren und spezifischen Antikörpern [218 - 220]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies auch für die Surfactant - Proteine A und - D gezeigt werden. So stieg die Konzentration beider Proteine in Tränenflüssigkeit bei Betroffenen mit Trockenen Augen signifikant um 168 (SP - A) bzw. 147 % (SP - D) an. Jedoch kann momentan noch nicht gesagt werden, ob dieser Anstieg von SP - A und - D die Ursache oder die Folge eines Trockenen Auges ist.

Störungen dieses komplexen immunologischen Surfactant - Systems könnten die sehr differenzierte humorale und zelluläre Immunabwehr der Augenoberfläche beeinträchtigen und so Infektionen u.a. Pathogenesen am Auge, wie etwa dem Trockenen Auge, Vorschub leisten.

4.7.2 Die hydrophoben Surfactant - Proteine SP - B und SP - C

Die kleinen, lipophilen und oberflächenaktiven Surfactant - Proteine SP - B und SP - C werden aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften in der oberflächlichen lipidhaltigen Phase des Tränenfilms vermutet. Nach Erkenntnissen aus der Lunge kann angenommen werden, dass beide wichtige Aufgaben für die Stabilität des Tränenfilms übernehmen, indem sie die Verankerung der oberflächlichen Schicht des Tränenfilms ermöglichen und so die Tränenverdunstung verhindern. Über ihre physikochemischen Eigenschaften und ihre hohe Hydrophobizität können sich SP - B und - C in die Lipidschicht einlagern und so die Spannung an der Tränenfilmoberfläche verringern, was ein Abreißen des Tränenfilms verhindert. Aus der Lunge ist bekannt, dass sie die Absorption und Spreizung von Phospholipiden in die Gas - Flüssigkeits - Interphase begünstigen und so ein Kollabieren der Alveolen verhindern [180]. Für den Tränenfilm könnte dies bedeuten, dass Veränderungen im physiologischen Expressionsverhalten von SP - B und - C zu einer Zunahme der Oberflächenspannung und so zu einem verfrühten Aufreißen des Tränenfilms führt, mit dem klinischen Korrelat von „Dry Spots“ auf der Augenoberfläche. Man kennt die Rolle der Lipide, die sich bei der Lidöffnung auf der Augenoberfläche ausbreiten und so die Oberflächenspannung reduzieren. Zudem weiß man um die Stellung der Muzine und der aus ihnen aufgebauten Oberflächenglykokalyx, die den Aufbau sowie die Haftung des Tränenfilms unterstützt. So führen Störungen des Lipidstoffwechsels zu einer Zunahme der Oberflächenspannung und Beeinträchtigungen in der Muzinhomeostase sowie durch Epithelschäden bzw. -apoptose zur Tränenfilminstabilität und darüber zur Benetzungsstörung der Augenoberfläche mit der Klinik eines Trockenen Auges. Durch diese Benetzungsstörung können Infektionen an der Augenoberfläche begünstigt werden.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen für beide lipophilen Proteine einen Konzentrationsanstieg in Tränenflüssigkeit bei Personen mit einem Trockenen Auge. SP - B stieg dabei um 11 % und für SP - C kam es sogar zu einem signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration um 43 % wenn ein Trockenes Auge diagnostiziert wurde. Dies könnte als kompensatorische Gegenregulation eines gestörten Augenoberflächenmilieus verstanden werden, um mit einem gesteigerten Gehalt der lipophilen Proteine SP - B und - C die Oberflächenspannung wieder zu reduzieren.

Daher führen die erbrachten Ergebnisse zu der Annahme, dass ein Mangel an SP - B und - C nicht ursächlich ein Trockenes Auge auslöst, sondern es zu einem Expressionsanstieg bei bereits vorhandener Erkrankung kommt, um gegenregulatorisch die Schädigung zu reduzieren. Da der Anstieg mit 11 (SP - B) bzw. 43 % (SP - C) im Vergleich zu den hydrophilen Surfactant - Proteinen nicht ganz so deutlich ausfällt, könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei den Betroffenen, wie bereits beschrieben, überwiegend niedrig gradige Verlaufsformen (88 % Stadium I) vorlagen und somit ein gegenregulatorischer Kompensationsversuch noch nicht so eindeutig zu Tage tritt.

Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, inwieweit Abweichungen und Störungen im Proteinhaushalt und im okulären - Surfactant - System zu Beeinträchtigungen der komplexen Abwehr- und Schutzmechanismen des Augen- und Tränenapparates führen und somit potentielle Auslöser für Erkrankungen der Augenoberfläche darstellen. Zu diesem Zweck könnten in funktionellen Studien u.a. rekombinant hergestellte Surfactant - Proteine zum Einsatz kommen. Für Funktionsanalysen könnten digitale 3 D - Strukturmodelle erstellt, sowie durch vergleichende Proteinmodellierungen aktive Regionen ermittelt werden, um theoretische Aspekte und Modellvorstellungen zu analysieren. Dies dient dem Verständnis der Regulationsmechanismen und Wirkungsweisen der Surfactant - Proteine und eröffnet möglicherweise neue Therapieoptionen, um Erkrankungen der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege zu verhindern bzw. zu behandeln.

5 Zusammenfassung

Endogene sowie exogene Faktoren führen über degenerative wie auch entzündliche Prozesse zu einer verminderten Produktion und / oder einer gestörten Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit und so zu einem der häufigsten chronischen Erkrankungen der Augenoberfläche, dem Trockenen Auge. Allein in Deutschland sind schätzungsweise 12 Millionen Menschen betroffen. Subjektive aber auch objektive Beschwerden führen dabei zu einem Unbehaglichkeitsgefühl mit Einschränkungen in der Lebensqualität. In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Western - Blot - Analysen die bisher bekannten Surfactant - Proteine (SP - A, - B, - C und - D) in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. Deren bisher vor allem in der Lunge sehr gut untersuchten oberflächenaktiven (SP-B / SP-C) und immunologischen (SP-A / SP-D) Funktionen sind bislang für die Augenoberfläche nur vermutbar. Um diese Funktionen besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche Entnahmetechniken von Tränenflüssigkeit (Kapillare vs. Schirmer - Streifen) auf ihre Proteingewinnung und -erforschung hin untersucht. Mittels Gesamtproteinbestimmung nach Bradford, Gel- und Membrananfärbung (Coomassie, Silbernitrat bzw. Ponceau) sowie Western - Blot - Analysen konnte gezeigt werden, dass sich der, bereits in der ophthalmologischen Diagnostik eingesetzte, Schirmer - Streifen als ein nicht invasives, molekularbiologisches Quantifizierungssystem eignet, um hydro- sowie lipophile Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes in Tränen quantitativ und qualitativ zu untersuchen. So wurde mittels Schirmer - Streifen von 306 Personen Tränenflüssigkeit generiert und jeder Teilnehmer mit einem spezifisch entwickelten Fragebogen befragt. Durch ELISA - Analysen konnte gezeigt werden, dass im Rahmen eines Trockenen Auges (n = 170) alle vier Surfactant - Proteine in erhöhten Konzentrationen vorlagen und somit für die Funktionalität und Stabilität des Tränenfilms und damit für die Gewebe der Augenoberfläche und des Tränensystems von Bedeutung sind. So werden SP - A und - D bei Pathologien der Augenoberfläche heraufreguliert um ihren direkten und indirekten antimikrobiellen Aufgaben sowie ihrem immunmodulierenden Einfluss auf Abwehrzellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems ebenso auf Schleimhäuten der Augenoberfläche und des Tränensystem nachzukommen. Die ebenfalls beim Trockenen Auge gesteigerten Konzentrationen der oberflächenaktiven Proteine SP - B und - C könnten als gegenregulatorisches Ereignis verstanden werden, um über eine Reduktion der Oberflächenspannung die Stabilität des Tränenfilms zu sichern bzw. wieder herzustellen.

Zusätzlich konnten mittels Fragebogen anamnestische Daten erhoben werden, die das facettenreiche Bild und die therapeutische Komplexität des Trockenen Auges bestätigten. Dabei sind besonders Frauen (59 %) und Personen ≥ 40 Jahre (88 %) von Trockenen Augen betroffen. Durchschnittlich sind Personen mit Trockenen Augen 60 Jahre alt und damit 10 Jahre älter als eine gesunde Vergleichsgruppe. Der Anteil Betroffener steigt ab 30 Jahre auf 50 % ihrer Altersgruppe an und nimmt bis zur 7. Lebensdekade auf über 70 % weiter zu. Frauen mit Trockenen Augen sind im Schnitt jünger und geben weniger subjektive Symptome und damit einen milderen Verlauf an, als ebenfalls an Trockenen Augen erkrankte Männer. Im Schirmer - I - Test zeigt sich bei Erkrankten eine Reduktion an gespendeter Tränenflüssigkeit um 23 % sowie nach Bradford eine Abnahme der in diesen Tränen enthaltenen Proteine um 18 %, wobei Männer immer weniger Proteine in ihren Tränen hatten als Frauen. In gesunder Tränenflüssigkeit konnte ein Proteingehalt von 5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ gemessen werden. Zudem zeigt sich mit zunehmendem Alter ebenfalls eine Reduktion der Tränenmenge sowie eine Abnahme der darin enthaltenen Proteine.

Zukünftige Arbeiten sollten analysieren, wie Veränderungen im Proteinhaushalt und im okulären - Surfactant - System zu Beeinträchtigungen am Augen- und Tränenapparat führen und somit potentielle Auslöser für Erkrankungen der Augenoberfläche darstellen. Dies soll dem Verständnis der physio- und pathologischen Regulationsmechanismen dienen und möglicherweise neue Therapieoptionen aufzeigen, um Erkrankungen der Augenoberfläche und der ableitenden Tränenwege zu verhindern bzw. zu behandeln.

6 Literaturverzeichnis

1. Schicht M, et al. Das Okuläre Surfactant System und seine Bedeutung beim Trockenen Auge. unpublished 2010:1
2. Cullor JS, et al. In vitro antimicrobial activity of defensins against ocular pathogens. Arch Ophthalmol 108 Jun 1990:861-4
3. Haynes RJ, et al. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. Br J Ophthalmol 83 Jun 1999:737-41
4. Fearson D, et al. The alternative pathway of complement: A system for host resistance to microbial infection. N Engl J Med 1980;303:259-61
5. Maurice, D. Structures and fluids involved in the penetration of topically applied drugs. Inter Ophthalmol Clinics 1980;20(3):7-20
6. Kurose, Y. Über die Tränenmenge bei gesunden Japanern. Acta Soc Ophthalmol Jap 1930;34:904 [Japan, Autorefer in Zbl Ges Ophthalmol 1931;24:48]
7. Rötth, A. On the hypofunction of the lacrimal gland. Amer J Ophthalmol 1941;24:20
8. Ito, T. The clinical studies on lacrimation. Report II. The modified method of Schirmers Test. J Clin Ophthalmol 1956;10:189 [Japan mit engl. Zusammenfassung]
9. Schirmer, O. Mikroskopische Anatomie und Physiologie der Tränenorgane. In A. Graefe u. Th. Saemisch, Handbuch der gesamten Augenheilkunde, 2. Aufl., Bd. I, Abt. 2, Kap. VII, Berlin: Springer 1931
10. Shigetoshi N, et al. Pharmacokinetics of Instilled Drugs in the Human Eye. Intern Ophthalmol Clin 1980;20(3):33-49
11. Mircheff AK. Lacrimal fluid and electrolyte secretion: a review. Curr Eye Res 1989:607-17
12. American Academy of Ophthalmology – Basic and Clinical Science Course Section 2, Fundamentals and Principles of Ophthalmology. 1994-1995:252
13. De Souza GA, et al. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. Genome Biol 2006;7(8):R72 Epub 2006 Aug 10
14. Report of the International Dry Eye WorkShop (DEWS) 2007. Ocul Surf 2007;5(2):61-204
15. Paulsen FP. Cell and molecular biology of human lacrimal gland and nasolacrimal duct mucins. Int Rev Cytol 2006:229-79
16. Paulsen FP, et al. Tear outflow. Impact of mucins and TFF-peptides. Ophthalmologie 2004:19-24

17. Qu XD, et al. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 1998;66:2791-9
18. Lozato PA, et al. Phase lipidique du film lacrymal: physiologie et pathologie. *J Fr Ophtalmol* 2001;24:643-58
19. Heiligenhaus A, et al. Diagnostik und Differenzierung von Benetzungsstörungen. *Ophthalmologe* 1995;92:6-11
20. Brewitt H, Zierhut M (Hrsg.). *Trockenes Auge*. Kaden, Heidelberg 2001
21. Beuerman RW, et al. The lacrimal functional unit. In: Pflugfelder SC, et al. (eds). *Dry eye and ocular surface disorders*. New York, Marcel Dekker, 2004
22. Stern ME, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-6
23. Erb C, et al. Psychosomatische Aspekte bei Patienten mit primärer Keratokonjunktivitis sicca. *Klin Monatsbl Augenheilk* 1996;208:96-9
24. Christen Wg, et al. Design of Physicians' Health Study II – a randomized trial of beta-carotene, vitamins E and C, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease, and eye disease, and review of results of completed trials. *Ann Epidemiol* 2000;10:125-34
25. Munoz B, et al. Causes of blindness and visual impairment in a population of older Americans: The Salisbury Eye Evaluation Study. *Arch Ophthalmol* 2000;118:819-25
26. Ladwig KH, et al. Gender differences of symptom reporting and medical health care utilization in the German population. *Eur J Epidemiol* 2000;16:511-8
27. Schicht M, et al. The ocular surface system and its relevance in the dry eye. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2010;227:864-70
28. U.S. Census Bureau. "U.S. Interim Projection by Age, Sex, Race, and Hispanic Origin: "<http://www.census.gov/ipc/www/usinterimproj/>; 18. März 2004
29. Ellwein LB, et al. Use of eye care and associated charges among the Medicare population: 1991-1998. *Arch Ophthalmol* 2002;120:804-11
30. Schaumberg DA, et al. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003;136:318-26
31. Doughty MJ, et al. Further analysis of the human spontaneous eye blink rate by a cluster analysis-based approach to categorize individuals with 'normal' versus 'frequent' eye blink activity. *Eye Contact Lens* 2006;32:294-9
32. Blehm CS, et al. Computer vision syndrome: a review. *Surv Ophthalmol* 2005;50:253-62

33. Nichols JJ, et al. Self-reported dry eye disease across refractive modalities. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1911-4
34. Tamer C, et al. Tear film tests in Parkinson's disease patients. *Ophthalmology* 2005;112:1795
35. Tsubota K, et al. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. *Arch Ophthalmol* 1995;113:155-8
36. Gilbard JP, et al. Ocular surface drying and tear film osmolarity in thyroid eye disease. *Acta Ophthalmol* 1983;61:108-16
37. Sullivan DA. Sex and sex steroid influences on the dry eye syndrome, in Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME (eds). *Dry eye and ocular surface disorders*. New York, Marcel Dekker, 2004
38. Sullivan DA, et al. Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Ann NY Acad Sci* 2002;966:211-22
39. Sullivan DA, et al. Sex steroids, meibomian gland dysfunction and evaporative dry eye in Sjogren's syndrome. *Lupus* 2002;11:667
40. Mantelli F, et al. Conjunctival mucin deficiency in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006 Nov 2
41. Sullivan BD, et al. Influence of aging on the polar and neutral lipid profiles in human meibomian gland secretions. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1286-92
42. Sullivan DA. Androgen deficiency and dry eye syndromes. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004;79:49-50
43. Sullivan BD, et al. Complete androgen insensitivity syndrome: effect on human meibomian gland secretions: *Arch Ophthalmol* 2002;120:1689-99
44. Schiffman RM, et al. A multi-center, double-masked, randomized, vehicle-controlled, parallel group study to evaluate the safety and efficacy of testosterone ophthalmic solution in patients with meibomian gland dysfunction. *ARVO e-abstract #5608,2006*
45. Smith JA, et al. Dry eye signs and symptoms in women with premature ovarian failure. *Arch Ophthalmol* 2004;122:151-6
46. Mathers WD, et al. Tear film changes associated with normal aging. *Cornea* 1996;15:229-34
47. Patel S, et al. Age-related changes in precorneal tear film stability. *Optom Vis Sci* 1989;66:175-8
48. Marquardt R. *Das Trockene Auge in Klinik und Praxis*. Springer, Berlin 1991
49. Tomlinson A, et al. Assessment of tear film dynamics: quantification approach. *Ocul Surd* 2005;3:81-95

50. Obata H, et al. Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging. *Ophthalmology* 1995;102:678-86
51. Matsuo T, et al. Incidence of ocular complications in rheumatoid arthritis and the relation of keratoconjunctivitis sicca with its systemic activity. *Scand J Rheumatol* 1997;26:113-16
52. Zierhut M, et al. Okuläre Beteiligung bei der progressiven systemischen Sklerodermie. *Der Ophthalmologe* 1996;93(Suppl.1):177
53. Haskes LP. Systemic lupus erythematosus. In: *Primary eyecare in systemic disease* (Hrsg.: Marks ES, Adamczyk DT, Thomann KH) Appleton and Lange, Connecticut 1995:227-32
54. Walsh JB, Joseph J. Polymyositis / Dermatomyositis. In: *The eye in systemic disease* (Hrsg.: Gold DH, Weingeist V) Lippincott, Philadelphia 1990:53-55
55. Nakamura H, et al. Mechanisms of autoantibody production and the relationship between autoantibodies and the clinical manifestations in Sjogren's syndrome. *Tran Res* 2006;148(6):281-8
56. Zoukhri D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res* 2006;82:885-98
57. Hayashi Y, et al. The role of caspase cascade on the development of primary Sjogren's syndrome. *J Med Invest* 2003;50:32-8
58. Moss SE, et al. Incidence of dry eye in an older population. *Arch Ophthalmol* 2004;122:369-73
59. Kaiserman I, et al. Dry eye in diabetic patients. *Am J Ophthalmol* 2005;139:498-503
60. Ozdemir M, et al. Ocular surface disorders and tear function changes in nodulocystic acne. *J Dermatol* 2005;32:174-8
61. Bron AJ, et al. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004;78:347-60
62. Miljanovic B, et al. Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *Am J Clin Nutr* 2005;82:887-93
63. Colev MH, et al. Vegan diet and vitamin A deficiency. *Clin Pediatr (Phila)* 2004;43:107-9
64. Jaworowski S, et al. Xerophthalmia and undiagnosed eating disorder. *Psychosomatics* 2002;43(6):506-7
65. Lee WB, et al. Ocular complications of hypovitaminosis a after bariatric surgery. *Ophthalmology* 2005;112:1031-4
66. Hori Y, et al. Differential regulation of membrane associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:114-22

67. Sommer A. Vitamin A deficiency and the global response. *Forum Nutr* 2003;56:33-5
68. Sommer A, Green WR. Goblet cell response to vitamin A treatment for corneal xerophthalmia. *Am J Ophthalmol* 1982;94:213-5
69. Sommer A, et al. Tear production in a vitamin A responsive xerophthalmia. *Am J Ophthalmol* 1982;93:84-7
70. Tseng SCG. Topical Tretinoin Treatment for Dry Eye Disorders. *Int Ophthalmol Clin* 1987;27:47-53
71. Lambert R, et al. Hyperkeratinization in a rabbit model of meibomian gland dysfunction. *Am J Ophthalmol* 1988;105:703-5
72. Lambert R, et al. Effects of 13-cis-retinoic acid on the hamster meibomian gland. *J Invest Dermatol* 1989;92:321-5
73. Wolkoff P, et al. Eye complaints in the office environment: precorneal tear film integrity influenced by eye blinking efficiency. *Occup Environ Med* 2005;62:4-12
74. McCulley JP, et al. Correlations in a change in aqueous tear evaporation with a change in relative humidity and the impact. *Am J Ophthalmol* 2006;141:758-60
75. Skyberg K, et al. Symptoms prevalence among office employees and associations to building characteristics. *Indoor Air* 2003;13:246-52
76. Nakaishi H, et al. Abnormal tear dynamics and symptoms of eyestrain in operators of visual display terminals. *Occup Environ Med* 1999;56:6-9
77. Paschides CA, et al. Ocular surface and environmental changes. *Acta Ophthal Scan* 1998;876:74-7
78. Brewitt H. Trockene Augen – Empfindliche Augen. *Augenärztliche Aspekte der Kosmetik. Z prakt Augenheilkd* 1998;19:55-60
79. Lindgren T, et al. Ocular, nasal, dermal and general symptoms among commercial airline crews. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:475-83
80. Whitwell J. Denervation of the lacrimal gland. *Br J Ophthalmol* 1958;42:518-25
81. Maitchouk DY, et al. Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. *Arch Ophthalmol* 2000;118:246-52
82. Nguyen DH, et al. The effects of sensory and parasympathetic denervation on the kinases and initiation factors vcontrolling protein synthesis in the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(PtA):65-70
83. Hovanesian JA, et al. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:577-84
84. Wilson SE. Laser in situ keratomileusis-induced (presumed) neurotrophic epitheliopathy. *Ophthalmology* 2001;108:1082-7

85. Albietsz JM, et al. Dry eye after LASIK: comparison of outcomes for Asian and Caucasian eyes. *Clin Exp Optom* 2005;88:89-96
86. Hammond MD, et al. Refractive surgery in the United States Army, 2000-2003. *Ophthalmology* 2005;112:184-90
87. De Paiva CS, et al. The incidence and risk factors for developing dry eye after myopic LASIK. *Am J Ophthalmol* 2006;141:438-45
88. Ram J, et al. Cataract surgery in patients with dry eyes. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:1119-24
89. Ram J, et al. Outcomes of phacoemulsification in patients with dry eye. *J Cataract Refract Surg* 2002;28:1386-9
90. Heigle TJ, et al. Aqueous tear production in patients with neurotrophic Keratitis. *Cornea* 1996;15:135-8
91. Yamada N, et al. Sensitizing effect of substance P on corneal epithelial migration induced by IGF-I, fibronectin, or interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:833-9
92. Yamada N, et al. Promotion of corneal epithelial wound healing by a tetrapeptide (SSSR) derived from IGF-I. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3286-92
93. Rees TD, et al. Blepharoplasty and the dry eye syndrome: guidelines for surgery? *Plast Reconstr. Surg* 1981;68:249-52
94. Guzey M, et al. A survey of trachoma: the histopathology and the mechanism of progressive cicatrization of eyelid tissues. *Ophthalmologica* 2000;214:277-84
95. Hingorani M, et al. Ocular cicatricial pemphigoid. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:373-8
96. Power WF, et al. Analysis of the acute ophthalmic manifestations of the erythema multiforme/Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis disease spectrum. *Ophthalmology* 1995;102:1669-76
97. Lemp MA. Basic principles and classification of dry eye disorders, in Lemp MA, Marquandt R (eds). *The dry eye: a comprehensive guide*. New York, Springer, 1992,pp101-31
98. Tutt R, et al. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4117-23
99. Gilbard JP, et al. A proposed mechanism for increased tear-film osmolarity in contact lens wearers. *Am J Ophthalmology* 1986;102:505-7
100. Nichols JJ, et al. Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1319-28
101. Knop E, et al. Conjunctival cytology in asymptomatic wearers of soft contact lenses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1992;230:340-7

102. Lievens CW, et al. Comparing goblet cell densities in patients wearing disposable hydrogel contact lenses versus silicone hydrogel contact lenses in an extended-wear modality. *Eye Contact Lens* 2003;29:241-4
103. Aragona P, et al. Morphological changes of the conjunctival epithelium in contact lens wearers evaluated by impression cytometry. *Eye* 1998;12:461-6
104. Pisella PJ, et al. Ocular surface changes induced by contact lens wear. *Cornea* 2001;20:820-5
105. Pritchard N, et al. Dehydration, lens movement and dryness ratings of hydrogel contact lenses. *Ophthalmic Physiol Opt* 1995;15:281-6
106. Richdale K, et al. Frequency of and factors associated with contact lens dissatisfaction and discontinuation. *Cornea* 2007;26:168
107. James DG, et al. Ocular sarcoidosis. *Br J Ophthalmol* 1964;48:461-70
108. Heath P. Ocular lymphomas. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1948;46:385-98
109. Chronister CL. Review of external ocular disease associated with aids and HIV infection. *Optom Vis Sci* 1996;73:225-30
110. Zegans ME, et al. Ocular manifestations of hepatitis C virus infection. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13:423-7
111. Merle HD, et al. Ocular manifestations in patients with HTLV-I associated infection. A Clinical study of 93 cases. *Jpn J Ophthalmol* 1996;40:260-70
112. Thomas O, et al. Long-term complications of total body irradiation in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:125-31
113. Ogawa Y, et al. Dry eye as a major complication associated with chronic graft-versus-host-disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Cornea* 2003;22(7 Suppl):19-27
114. Suh DW, et al. Ocular findings after bone marrow transplantation in a pediatric population. *Ophthalmology* 1999;106:1564-70
115. Abelson MB, et al. Ocular allergic disease: Mechanisms, disease subtypes, treatment. *Ocul Surf* 2003;1:127-49
116. Fujishima H, et al. Allergic conjunctivitis and dry eye. *Br J Ophth* 1996;80:994-7
117. Luo L, et al. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens* 2005;31:186-93
118. De Paiva CS, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res* 2006;83:526-35
119. Pepose JS, et al. Mononuclear cell phenotypes and immunoglobulin gene rearrangements in lacrimal gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *Ophthalmology* 1990;97:1599

120. Niederkorn JY, et al. Dessicating stress induces T-cell mediated Sjogren's syndrome-like lacrimal keratoconjunctivitis sicca. *J Immunol* 2006;176:3950-7
121. Yeh S, et al. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:124-9
122. Kunert KS, et al. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120:330-7
123. Zhao H, et al. Quantification of MUC-5AC protein in human tears. *Cornea* 2001;20:873-7
124. Shimazaki J, et al. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol* 1995;113:1266-70
125. Qian L, et al. Altered traffic to the lysozyme in an ex vivo lacrimal acinar cell model for chronic muscarinic receptor stimulation. *Exp Eye Res* 2004;79:665-75
126. Benitez-Del-Castillo JM, et al. Relation between corneal innervation with confocal microscopy and corneal sensitivity with noncontact esthesiometry in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:173-81
127. Bourcier. Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2341-5
128. Gulati A, et al. Validation and repeatability of a short questionnaire for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 2006;142:125-31
129. Miljanovic B, et al. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol* 2007;143:409-15
130. Reddy P, et al. The economic burden of dry eye: a conceptual framework and preliminary assessment. *Cornea* 2004;23:751-61
131. Mertzanis P, et al. The relative burden of dry eye in patients' lives: comparisons to a US normative sample. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:46-50
132. Nelson J, et al. Topical fibronectin in the treatment of Keratoconjunctivitis sicca. Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group. *Am J Ophthalmol* 1992;114:441-7
133. Brewitt H, Morphologische Befunde des Hornhautepithels bei Störung des prä-kornealen Filmes und nach Applikation von Augenmedikamenten. Eine raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung. In: *Chronische Konjunktivitis - Trockenes Auge* (Hrsg. Marquardt R) Springer, Wien 1982:35-57
134. Beetham WP. Filamentary keratitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1936;33:413-35
135. Baxter SA, et al. Punctal plugs in the management of dry eyes. *Ocul Surf* 2004;2:255-65
136. Nilforoushan MR, et al. Effect of artificial tears on visual acuity. *Am J Ophthalmol* 2005;140:830-5

137. Tsubota K, et al. Spectacle side panels and moist inserts for the treatment of dry-eye patients. *Cornea* 1994;13:197-220
138. Pullum KW, et al. Scleral contact lenses: the expanding role. *Cornea* 2005;24:269-77
139. Jaeger W. Die Behandlung schwerer Verlaufsformen der Keratoconjunctivitis sicca mit Eledoisin. *Klein Mbl Augenheilkd* 1988;192:163-6
140. Tauber J, et al. Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS 365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye. *Cornea* 2004;23:784-92
141. Urashima H, et al. Rebamipide increases the amount of mucin-like substances on the conjunctiva and cornea in the N-acetylcysteine treated in vivo model. *Cornea* 2004;23:613-9
142. Toshida H, et al. Effect of gefarnate on the ocular surface in squirrel monkeys. *Cornea* 2002;21:292-9
143. Masuda K, et al. Effect of topical ecabet sodium on mucin levels in the tear fluid of patients with dry eye. *SERI-ARVO2003*
144. Ubels JL, et al. Topically applied 15-(S)-HETE stimulates mucin production by corneal epithelium. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt A):317-21
145. Aragona P, et al. Conjunctival epithelium improvement after systemic pilocarpine in patient with Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 2006;90:166-70
146. Ono M, et al. Therapeutic effect of cevimeline on dry eye in patients with Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind clinical study. *Am J Ophthalmol* 2004;138:6-17
147. Schroder C, et al. Transplantation of the submandibular gland in absolute dry eyes. Effect on the ocular surface. *Klein Monbl Augenheilkd* 2002;219:494-501
148. Noda-Tsuruya T, et al. Autologous serum eyedrops for dry eye after LASIK. *J Refract Surg* 2006;22:61-6
149. Brignole F, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporine A. *Invest Ophth Vis Sci* 2001;42:90-5
150. Avunduk AM, et al. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory drops in dry eye patients; A clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol* 2003;136:593-602
151. Pflugfelder SC, et al. A randomized, double-masked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5 % and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol* 2004;138:444-57

152. Sapadin AN, et al. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:258-65
153. Kaluza G. *Autogenes Training in der Augenheilkunde*. Kaden, Heidelberg 1994
154. Nepp J, et al. Über die Wirksamkeit der Akupunktur bei Konjunktivitis sicca. *Spektrum Augenheilkd.* 1996;10:150
155. Rieger G, et al. Zur Wirkungsdauer balneotherapeutischer Maßnahmen bei Patienten mit Beschwerden des trockenen Auges. *Spektrum Augenheilkd* 1997;11:255
156. Klaus MH, et al. Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1961;47:1858-9
157. Polin RA, et al. Fetal and neonatal physiology. 1997:1275-83
158. Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 1955:1125-6
159. Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant associated protein. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:990-8
160. Paananen R, et al. Surfactant proteins A and D in Eustachian tube epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:660-7
161. Kim, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol* 2007;292:879-84
162. Mo YK, et al. Surfactant protein expression in human skin: evidence and implications. *J Invest Dermatol* 2007;127:381-6
163. Sati L, et al. Lung surfactant proteins in the early human placenta. *Histochem Cell Biol* DOI 10.1007/s00418-009-0642-9
164. Bräuer L, et al. Human parotid and submandibular glands express and secrete surfactant proteins A, B, C and D. *Histochem Cell Biol* 2009;132(3):331-8
165. Madsen J, et al. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000:5866-70
166. Stahlman MT, et al. Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues. *J Histochem Cytochem* 2002:651-60
167. Leth-Larsen R, et al. Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol Hum Reprod* 2004:149-54
168. Bräuer L, K, et al. Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3954-53
169. Bräuer L, et al. Detection and localization of the hydrophobic surfactant proteins B and C in human tear fluid and the human lacrimal system. *Curr Eye Res* 2007;32:931-8
170. Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998:177-201

171. Voorhout WF, et al. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physio* 1992;263:479-86
172. Voss T, et al. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1991:88-94
173. Cole FS, et al. Genetic disorders of neonatal respiratory function. *Ped Res* 2001;50:157-62
174. Creuwels L, et al. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997;175:1-39
175. Hoppe HJ, Reid KB. Trimeric C-type lectin domains in host defence. *Structure* 1994:1129-33
176. Iwaarden van F, et al. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:91-8
177. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physio Rev* 1997:931-62
178. Brodsky-Doyle B, et al. Circular-dichroism and electron-microscopy studies of human subcomponent c1q. *Biochem J* 1976:279-80
179. LeVine AM, et al. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998:700-8
180. Yu SH, et al. Role of bovine pulmonary surfactant-associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures. *Biochem Biophys Acta* 1990;1046:233-41
181. Veldhuizen E, et al. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochem Biophys Acta* 2000;1467:255-70
182. Korfhagen TR, et al. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci* 1996:9594-9
183. Crouch E, et al. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001;63:521-54
184. Golde van LM. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol Neonate* 1995;67:2-17
185. Botas C, et al. Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:11869-74
186. Wert SE, et al. Increased Metalloproteinase Activity, Oxidant Production, and Emphysema in Surfactant Protein D Gene-Inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000:5972-7
187. Phizackerley PJ, et al. Hydrophobic proteins of lamellated osmophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem J* 1979;183:731-6

188. Whitsett JA, et al. Immunologic identification of a pulmonary surfactant-associated protein of molecular weight = 6000 daltons. *Pediatr Res* 1986;20:744-9
189. Whitsett JA, et al. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr Res* 1986;20:460-7
190. Weaver TE. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochem Biophys Acta* 1998;1408:173-9
191. Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab* 1998;64:217-28
192. Weaver TE, et al. Use of knockout mice to study surfactant protein structure and function. *Biol Neonate* 1999;76:15-8
193. Thompson MW. Surfactant protein B deficiency.: insights into surfactant function through clinical surfactant protein deficiency. *Am J Med Sci* 2001;321:26-32
194. Stahlman MT, et al. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* 2000;80:395-403
195. Kaser MR, et al. Inhibition of bacterial growth by synthetic SP-B1-78 peptides. *Peptides* 1997;18:1441-4
196. Friedrich W, et al. Surfactant protein SP-B counteracts inhibition of pulmonary surfactant by serum proteins. *Eur J Med Res* 2000;5:277-82
197. Kobayashi T, et al. Activity of pulmonary surfactant after blocking the associated proteins SP-A and SP-B. *J Appl Physiol* 1991;71:530-6
198. Tavena SG, et al. Adsorption of pulmonary surfactant protein SP-A to monolayers of phospholipids containing hydrophobic surfactant protein SP-B or SP-C: potential differential role for tertiary interaction of lipids, hydrophobic proteins and SP-A. *Biochemistry* 2000;39:6083-93
199. Amirkhanian JD, et al. Full length synthetic surfactant proteins SP-B and SP-C reduce surfactant inactivation by serum. *Bioch et bioph Acta* 1993;1168:315-20
200. Spragg RG, et al. The adult respiratory distress syndrome: clinical aspects relevant to surfactant supplementation. In: Robertson B. *Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to clinical Practice*. Elsevier, Amsterdam. 1992:685-703
201. Bräuer L, et al. Tear film and ocular surface surfactants. *J Epithelial Biol Pharmacol* 2008;1:62-7
202. Sjögren H.: Zur Kenntnis der Keratoconjunctivitis sicca. *Acta ophthal. (Kbh.) Suppl. 2* 1933
203. Rötth A. Lacrimation in normal eyes. *Arch Ophthal (Chicago)* 1953;49:185
204. Eisner G. Zur Brauchbarkeit des Schirmer-Testes. *Graef Arch* 1960;162:286-98

205. Lipschütz H. Über die Befeuchtung des Auges. *Z. Augenheilkunde* 1933;80:63
206. Murube J, et al. Triple Classification of Diagnosis of Dry Eye. *Ocul Surf* 2008;6,2:1-8
207. Jäger K, et al. Functional relationship between cationic amino acid transporters and β -defensins: implications for dry skin diseases and dry eye. 2010 unpubl.
208. Tsukahara S, et al. Tanishima T. Adrenergic and cholinergic innervation of the human lacrimal gland. *Jap J Ophthalmol* 1974;18:70
209. Dartt DD. Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion. A review. *Curr Eye Res* 1989;8:619
210. Sherlock S, et al. Nutritional and metabolic liver disease. In: *Diseases of the liver and biliary system*. Blackwell Sciences. Oxford 1997:427-53 In: Purucker E, et al. *Thiemes Innere Medizin*. Thieme Verlag, Stuttgart 1999:722
211. Fullard R. Tear proteins arising from lacrimal tissue. In: *Principles and Practice of Ophthalmology. Basic Sciences*. (Hrsg.: Albert DM, Jakobiec FA) Saunders, Philadelphia 1994:473-8
212. Kruse FE. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 1994;8:170-83
213. Steuhl KP, et al. Altersabhängige Verteilung von Langerhans-Zellen innerhalb humanem Konjunktivaepithel. *Ophthalmologe* 1995;92:21-5
214. Araki-Sasaki K, et al. An SV 40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:614-21
215. Shepherd VL. Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:257-60
216. Kuronuma K, et al. Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A. *J Biol Chem* 2004;279:21421-30
217. Ni M, et al. Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2005;73:2147-56
218. Ballou M, et al. Complement proteins and C3 anaphylatoxin in the tears of patients with conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:473-6
219. Ballou M, et al. Tear lactoferrin levels in patients with external inflammatory ocular disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:543-5
220. Pleyer U, et al. Immune response to *Staphylococcus epidermidis*-induced endophthalmitis in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2650-63

7 Thesen

1. Die bisher bekannten Surfactant - Proteine (SP - A, - B, - C und - D) werden in Tränendrüse und Tränenflüssigkeit des Menschen exprimiert und produziert. Beeinträchtigungen dieses okulären - Surfactant - Systems könnten zu erheblichen Störungen der komplexen Abwehr- und Schutzmechanismen des Augen- und Tränenapparates führen und potentielle Auslöser für diverse Pathologien an der Augenoberfläche, wie etwa dem Trockenen Auge darstellen.
2. Für die Tränengewinnung aus dem Bindehautsack eignen sich als Entnahmetechniken sowohl die Kapillare als auch der Schirmer - Streifen. Dabei können Proteine unterschiedlicher Größe und physikochemischer Eigenschaften aus Tränen gewonnen sowie molekularbiologisch untersucht werden.
3. In Tränenflüssigkeit von Personen mit Trockenen Augen kam es im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe zu einem Anstieg aller vier Surfactant - Proteine. Der Anstieg der immunologisch aktiven SP - A und - D spiegelt dabei die entzündliche Komponente dieser Erkrankung wieder und dient vermutlich der unspezifischen sowie der spezifischen Immunabwehr am Auge, um die Integrität einer immunologischen Barriere an der Augenoberfläche zu unterstützen. Der Anstieg der oberflächenaktiven SP - B und - C in Tränen bei Trockenen Augen könnte als kompensatorische Gegenregulation eines gestörten Augenoberflächenmilieus verstanden werden, um die Oberflächenspannung des Tränenfilms wieder normalisierend herabzusetzen und zu stabilisieren.
4. Die Anzahl an Betroffenen mit Trockenen Augen nimmt mit dem Alter zu. Ab dem 30. Lebensjahr steigt der prozentuale Anteil an Betroffenen in der jeweiligen Altersgruppe, unabhängig vom Geschlecht, auf 50 % und höher an. 89 % der Betroffenen waren 40 Jahre und älter, wobei das Durchschnittsalter mit 60 Jahren 10 Jahre höher lag als in der gesunden Vergleichsgruppe.
5. Frauen sind häufiger (59 %) von Trockenen Augen betroffen als Männer. Sie waren im Schnitt jünger und schilderten weniger Symptome als ebenfalls an Trockenen Augen erkrankte Männer.
6. Die Beschwerden eines Trockenen Auges treten vermutlich bei Frauen nicht eher und auch nicht schwächer, sondern bei beiden Geschlechtern gleichzeitig und gleich stark auf. Männer gehen aber vermutlich erst ab einem gewissen Beschwerdegrad und damit später zum Arzt, obwohl die Tränensekretion bereits vermindert ist.

7. Ab dem 40. Lebensjahr kommt es zu einer Reduktion der Tränensekretion. Im Schirmer - I - Test nimmt die Tränenmenge bei Trockenen Augen im Sinne einer Tränenhyposekretion um 23 % ab.
8. Der Proteingehalt in Tränenflüssigkeit nimmt mit zunehmendem Alter um bis zu 28 %, sowie bei Betroffenen mit Trockenen Augen um 18 % ab.
9. 65 % der Betroffenen gaben mehr als ein Symptom eines Trockenen Auges an, was das facettenreiche Erscheinungsbild verdeutlicht. Dabei sinkt mit der Anzahl an Symptomen eines Trockenen Auges in Tränen die Gesamte proteinkonzentration von einem zu vier Symptomen stetig um etwa 27 %, als Zeichen einer zunehmenden Zellschädigung und einem Verlust an Proteinen.
10. Bei schweren Verlaufsformen eines Trockenen Auges mit fünf oder mehr Symptomen steigt in Tränen die Proteinkonzentration um bis zu 55 % an. Eine im Verlauf der Erkrankung steigende Proteinkonzentration in der Tränenflüssigkeit verdeutlicht, dass sich unter einem Trockenen Auge erst später bzw. erst ab einem gewissen Schweregrad eine entzündliche Komponente entwickelt und so die Augenoberflächenentzündung mit gesteigerter Expression von Zytokinen nicht unbedingt ursächlich vorliegen muss, sondern im Laufe der Pathogenese als Reaktion auf ein gestörtes Oberflächenmilieu erst entsteht.
11. Bildschirmarbeit (Office Eye Syndrome), chronische Entzündungen und Klimaanlagen führen zu Trockenen Augen.
12. Ein Östrogenüberangebot kann bei Frauen zum gleichzeitigen Auftreten von Trockenen Augen und einem Uterus myomatosus führen.
13. Die medikamentöse Therapie von Erkrankungen des Herz - Kreislauf - Systems kann das Entstehen eines Trockenen Auges begünstigen.
14. Beeinträchtigungen im Lipidstoffwechsel können neben einem Trockenen Auge bei Veränderungen im Fettsäureumsatz zu einer Fettleber bzw. bei Störungen in der Biosynthese von Cholesterin oder auch von Triglyceriden zu einer primären Hyperlipoproteinämie führen.
15. Erkrankungen des Magen - Darm - Traktes führen neben einer Fehlernährung zu Resorptionsstörungen von Tränenflüssigkeit, beeinträchtigen damit den Regelkreislauf der Tränenhomöostase und führen so zu Trockenen Augen.
16. Veränderungen im Prostaglandin - Haushalt beeinträchtigen im Magen die protektiv auf die Schleimhaut wirkende Bicarbonatsekretion, und am Auge die Sekretion der, für die Integrität der Augenoberfläche wichtigen, Glykoproteine.
17. Viele Erkrankungen haben ähnliche Ursachen wie das Trockene Auge und liegen somit in einer gewissen Komorbidität vor, ohne jedoch im direkten ätiologischen Zusammenhang zu stehen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Posa
Geburtsdatum: 13.04.1983
Geburtsort: Karl - Marx - Stadt
Staatsangehörigkeit: Deutschland

Schulbildung

09/1989 – 08/1990 POS Peter - Tschaikowski in Karl - Marx - Stadt
09/1990 – 08/1993 Theodor - Körner Schule in Chemnitz
09/1993 – 08/2001 Alexander - von - Humboldt Gymnasium in Chemnitz
Abschluss: Hochschulreife

Wehr- / Ersatzdienst

08/2001 – 06/2002 Zivildienst: Klinikum Chemnitz gGmbH in Chemnitz
Geriatrisches Rehabilitationszentrum

Berufsausbildung

09/2002 – 08/2005 Ausbildung: Krankenpfleger
Klinikum Chemnitz gGmbH in Chemnitz
Abschluss: Gesundheits- und Krankenpfleger

Berufstätigkeit

07/2002 – 08/2002 Pflegerische Hilfskraft
Klinikum Chemnitz gGmbH in Chemnitz
Geriatrisches Rehabilitationszentrum
09/2005 – 08/2006 Gesundheits- und Krankenpfleger
Klinikum Chemnitz gGmbH in Chemnitz
Stellenpool für Intensivstation / Rettungsstelle

Studium

seit 10/2005 Humanmedizin
Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg
09/2007 Physikum

Hilfswissenschaftliche Tätigkeiten

Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg
2007 – 2009 Institut für Anatomie und Zellbiologie
2008 – 2009 Julius - Bernstein - Institut für Physiologie
2009 – 2010 Univ.-klinik f. Anästhesiologie und operat. Intensivmedizin

Friedrich - Alexander - Universität Erlangen - Nürnberg
2010 – 2011 Institut für Anatomie II

Promotion

seit 10/2007 Institut für Anatomie und Zellbiologie,
Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg
Doktorvater: Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen
Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Lars Bräuer
Thema: Das humane okuläre Surfactant System

Wissenschaftspreise

2009 Sicca - Förderpreis 2009 des BVA

Vorträge

- 2009 Kongress der Dt. Ophthalmolog. Gesellschaft - Leipzig
Proteinkonzentrationen im humanen okulären Surfactant System
und deren Einfluss auf das Trockene Auge
- 2011 1. Doktorandenkongress der MLU Halle - Wittenberg
Proteinmodulation in Tränenflüssigkeit

Veröffentlichungen

- 2009 Ophthalmologische Nachrichten
Regulationsstörung beim Sicca - Syndrom; Posa
- Poster: 26. Tagung der Anatom. Gesellschaft - Würzburg
Schirmer strip vs. capillary method: A non - invasive way to gain
proteins from tear fluid; Posa, Paulsen, Bräuer
- 2010 Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde
Das Okuläre Surfactant System und dessen Rolle bei entzünd-
lichen Erkrankungen der Augenoberfläche; Schicht, Posa,
Paulsen, Bräuer
- Functional relationship between cationic amino acid transporters
and beta - defensins: implications for dry skin diseases and the
dry eye; Jäger, Garreis, Posa, Dunse, Paulsen
- Poster: 6th Intern. Conference on the TFOS - Florence
Ocular surfactant proteins and their regulation in dry eye disease
Schicht, Posa, Paulsen, Bräuer
- Poster: 27. Tagung der Anatom. Gesellschaft - Würzburg
Ocular surfactant proteins and their regulation in dry eye disease
Schicht, Posa, Paulsen, Bräuer

Famulaturen / Praktika

Deutschland

- 2008 Praxis für Augenheilkunde, Halle / Saale
Univ.-klinik für Augenheilkunde, Dresden
Praxis für Augenheilkunde, Volkach am Main
Univ.-klinik für Anästhesiologie, Charité - Berlin
Hospitant im NEF, DRK Halle / Saale
- 2009 Innere Med. Klinik 6 / Gastroenterologie, Nürnberg
Universitätsklinik für Neurologie, Jena

Ausland

- 2009 Gandaki Western Regional Hosp., ER, Pokhara - Nepal
- 2010 State Central Clinic II, ICU, Ulaanbaatar - Mongolei
Reflex Clinic of Neurology, Ulaanbaatar - Mongolei
Public Hospital II, Clinic of ENT, Beihai - China

Praktisches Jahr 2011/12

1. Tertial Univ.-klinik für Innere Medizin III / ZNA, Halle / Saale
2. Tertial Univ.-klinik für Neurologie, Halle / Saale
3. Tertial Univ.-klinik für Unfall- u. Wiederherstellungschirurgie, Halle / Saale

Erklärung zur Selbstständigkeit und früheren Promotionsversuchen

Ich versichere hiermit, dass ich die dieser Arbeit zugrunde liegende Datenerhebung und Auswertung selbstständig durchgeführt und niedergeschrieben habe.

Ich habe keine anderen als die von mir aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt und die inhaltlich übernommenen Abschnitte des verwendeten Schrifttums einzeln kenntlich gemacht.

Andreas Posa

Halle / Saale, 24.04.2012

Ich versichere, dass ich die Dissertation bisher keiner anderen Fakultät zur Zulassung vorgelegt und keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Andreas Posa

Halle / Saale, 24.04.2012