

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinische Abteilung für Kleintierchirurgie Organisationseinheit: Augenstation

(Leiterin: Ao. Univ.-Profⁱⁿ Drⁱⁿ med. vet.

Barbara Nell, Dipl. ECVO)

**Immunohistochemische Darstellung von Immunglobulin G
in gesunden Pferde-, Hunde- und Katzenhornhäuten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines

DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Tierärztin Verena Maria Herb

Wien, im März 2022

*Meiner Familie
gewidmet*

Betreuer/in und Gutachter/in

Erstbetreuer/in:

Department/Universitätsklinik für Kleintiere und Pferde
Klinische Abteilung für Kleintierchirurgie, Augenstation
Nell, Barbara, Ao. Univ.-Profⁱⁿ Drⁱⁿ med. vet., Dipl. ECVO

Zweitbetreuer/in:

Department für Pathobiologie
Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin
Url, Angelika, Ass.-Profⁱⁿ Drⁱⁿ med. vet.

Gutachter/in:

Department für Pathobiologie
Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin
Weissenböck, Herbert, Univ.-Prof. Dr. med. vet., Dipl.ECPHM

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1. 1.	Die Hornhaut und das korneale Immunprivileg	- 1 -
1. 2.	Immun-vermittelte Pathologien der Hornhaut	- 3 -
1. 3.	Das humorale Immunsystem und Immunglobuline	- 4 -
1. 4.	Immunglobuline in der menschlichen und tierischen Hornhaut	- 5 -
1. 5.	Immunhistochemischer Nachweis von IgG in der Hornhaut	- 6 -
1. 6.	Fragestellung	- 7 -
2	Publikation	- 8 -
3	Erweiterte Resultate	-16-
4	Erweiterte Diskussion	-25-
4. 1.	Gesunde Hornhäute	-25-
4. 2.	Pathologisch veränderte Hornhäute	-27-
4. 3.	Methodik	-30-
4. 4.	Einschränkungen und Ausblick	-32-
5	Zusammenfassung	-34-
6	Summary	-35-
7	Abkürzungsverzeichnis	-36-
8	Literaturverzeichnis	-37-
9	Danksagung	-44-

1 Einleitung

1. 1. Die Hornhaut und das korneale Immunprivileg

Die Hornhaut ist der gewölbte vordere Teil der äußeren Augenhaut und die vordere Begrenzung des Augapfels. Sie stellt das klare, je nach Spezies runde bis querovale Fenster für den Lichteintritt in das Auge dar und leistet zugleich einen Großteil der Lichtbrechung. Um diesen Funktionen gerecht zu werden, ist sie im physiologischen Zustand durchsichtig und avaskulär (Nishida et al. 2016, Whitley und Hamor 2021).¹ In der Peripherie geht die Hornhaut in den stark vaskularisierten Limbus über (Nishida et al. 2016), welcher die Begrenzung zur Lederhaut darstellt. Außen liegt der Hornhaut der präkorneale Tränenfilm auf, der mit ihr eine funktionelle Einheit hinsichtlich der Lichtbrechung bildet; auf der Innenseite steht sie als vordere Begrenzung der vorderen Augenkammer in Kontakt mit dem Kammerwasser. Die Ernährung der Hornhaut erfolgt ausschließlich per Diffusion aus den kapillaren Blutgefäßen des limbalen Randschlingennetzes, aus dem präkornealen Tränenfilm und dem Kammerwasser (Nishida et al. 2016, Meekins et al. 2021).

Die Hornhaut kann in ihrem Aufbau in vier Schichten unterteilt werden. Das mehrschichtige, nicht-verhornende Epithel stellt die äußerste Schicht dar; es weist eine Basalmembran auf, an der die Basalzellen anhaften, welche sich nach außen hin weiter zu Flügelzellen und schließlich Schuppenzellen entwickeln (Nishida et al. 2016, Meekins et al. 2021). Das Hornhautstroma ist die dickste Schicht und enthält Transparenz erlaubend geschichtete Kollagenfasern, vereinzelte spindelförmige Fibroblasten sowie eine extrazelluläre Matrix, die aus Wasser, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und anderen wasserlöslichen Molekülen besteht (España und Birk 2020). Angrenzend an das Stroma befindet sich die Descemet-Membran, welche die azelluläre Basalmembran der innersten Hornhautschicht, des einschichtigen Endothels, darstellt (Nishida et al. 2016). Beim Menschen wird als zusätzliche Schicht die azelluläre Bowman-Schicht

¹ Da speziesspezifische Ausnahmen von dieser Regel existieren, beispielsweise die physiologischerweise vaskularisierte Hornhaut der Seekuh, beziehen sich die anatomischen Beschreibungen in dieser Dissertationsschrift auf die gemeinsamen Charakteristika der Hornhaut von Mensch, Kaninchen und den veterinärophthalmologisch relevantesten Tierarten Hund, Katze und Pferd.

zwischen epithelialer Basalmembran und Stroma unterschieden (Nishida et al. 2016). Da die Funktionen der einzelnen Hornhautschichten nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift sind, wird diesbezüglich auf die einschlägige Literatur verwiesen (Nishida et al. 2016, Espana und Birk 2020, Meekins et al. 2021).

Die Hornhaut ist in der Regel im Zentrum am dünnsten und wird zum Limbus hin dicker (Mishima 1968); die Gesamtdicke der Hornhaut sowie des Hornhautepithels variiert speziesspezifisch (Tab. 1). Weiters haben Tierrasse (Meekins et al. 2021), Alter (Gilger et al. 1991, Gilger et al. 1993, Herbig und Eule 2015) sowie Tageszeit (Martin-Suarez et al. 2014, Garzon-Ariza et al. 2017) Einfluss auf die physiologische Dicke der intakten Hornhaut.

Tab. 1. Vergleichende Gesamtdicke der Hornhaut von Mensch, Kaninchen, Pferd, Hund und Katze.

	Mensch	Kaninchen	Pferd	Hund	Katze
Zentrale Hornhautdicke (μm)	500 (Mishima 1968)	381,6 \pm 27,3 (Li et al. 1997)	800 \pm 50 (Pinto und Gilger 2014)	610,56 \pm 57,48 (Wolfel et al. 2018)	548,93 \pm 39,05 (Cleymaet et al. 2016)
Epitheldicke (μm)	50 (Nishida et al. 2016)	47,7 \pm 2,2 (Li et al. 1997)	175 (Pirie et al. 2014)	25–40 (Meekins et al. 2021)	25–40 (Meekins et al. 2021)

Gemeinsam mit dem präkornealen Tränenfilm und der Bindehaut ist die Hornhaut Teil des funktionalen Systems der Augenoberfläche, das permanent mit der Außenwelt in Kontakt steht und dem somit nicht nur eine mechanische Schutzfunktion zukommt (Nishida et al. 2016, Whitley und Hamor 2021). Erstgenannte Anteile sind reich an immunologischen Abwehrmechanismen, so enthält die Tränenflüssigkeit in großen Mengen wasserlösliche Bestandteile des angeborenen als auch adaptiven Immunsystems, u.a. Immunglobuline, Lysozym und Lactoferrin (Ciralski et al. 2016, English und Gilger 2021). Die stark vaskularisierte Bindehaut ist reich an Abwehrzellen und verfügt zudem über das Konjunktiva-assoziierte lymphoide Gewebe (Knop und Knop 2007). Im Hornhautgewebe selbst fehlen jedoch physiologischerweise sowohl Blut- als auch Lymphgefäße (Cursiefen et al. 2002), ebenso sind Antigen-präsentierende Zellen nur im peripheren Hornhautepithel (Langerhans-Zellen) sowie sehr vereinzelt im Hornhautstroma (dendritische Zellen) enthalten (Hamrah et al. 2003, English und Gilger 2021, Liu und Li 2021). Dadurch kommt

es in der Hornhaut zu einer verzögerten Antigenerkennung und somit zu einer verlangsamten Immunantwort (Steuhl 2000). Dieses Phänomen wird geläufig unter dem Begriff des kornealen Immunprivilegs geführt und wird für die bessere Prognose von Hornhauttransplantationen im Vergleich zu anderen Organtransplantaten verantwortlich gemacht (Medawar 1948, Taylor 2016).

1. 2. Immun-vermittelte Pathologien der Hornhaut

In der Augenheilkunde sind immun-vermittelte Keratopathien weit verbreitet; manche werden durch infektiöse Erreger oder andere exogene Noxen angestoßen, während anderen mutmaßlich oder bewiesenermaßen eine auto-immune Genese zugrunde liegt (Ciralski et al. 2016, Brooks et al. 2017, Whitley und Hamor 2021). Als mutmaßlich auto-immunvermittelt gelten in der Veterinärophthalmologie Keratopathien, die auf immun-suppressive bzw. immun-modulierende Therapie ansprechen und bei denen bisher kein ätiologischer exogener Auslöser identifiziert werden konnte (Brooks et al. 2017, Glaze et al. 2021, Whitley und Hamor 2021).

Allen immun-vermittelten Keratopathien gemein ist die potenziell verheerende Auswirkung auf die korneale Transparenz und somit das Sehvermögen (Streilein et al. 1977, Whitcher et al. 2001). Im Zuge des immun-vermittelten Geschehens kommt es zur Einwanderung von Immunzellen in das Hornhautgewebe, kornealer Gefäßeinsprossung, einem Hornhautödem, einem Entzündungsgeschehen und darauffolgend zur Vernarbung oder sogar Pigmentierung der Hornhaut (Ciralsky et al. 2016, Grahn und Peiffer 2021). Die Erkrankungen sind meist zumindest unangenehm, oft jedoch schmerzhaft und schränken die Lebensqualität der Betroffenen ein (Reynaud et al. 2017). Häufig ist eine protrahierte Therapie, im Fall von auto-immunen Keratopathien teilweise sogar lebenslange lokale Immunsuppression oder -modulation erforderlich (Brooks et al. 2017, Glaze et al. 2021, Whitley und Hamor 2021). Kann der Krankheitsverlauf nicht kontrolliert werden, droht der Verlust des Sehvermögens (Whitcher et al. 2001, Singh et al. 2022). Beim Menschen kann diesem unter Umständen mittels einer Hornhauttransplantation abgeholfen werden (Hannush und Riveroll-Hannush 2016), in der Veterinärophthalmologie sind die diesbezüglichen Möglichkeiten jedoch noch eingeschränkt (Whitley und Hamor 2021).

Beispiele für immun-vermittelte Keratopathien in der Humanophthalmologie sind Herpes-simplex-Keratitis, welche durch das humane Herpes-simplex-Virus ausgelöst wird (Pepose 1991, Streilein et al. 1997), und periphere ulzerative Keratitis, die mutmaßlich auto-immunbedingt bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis vorkommen kann

(Aiello et al. 2021). In der Veterinärophthalmologie wären als mutmaßlich auto-immunbedingte Beispiele beim Hund die chronische superfizielle Keratitis (CSK; auch: Schäferhundkeratitis) (Campbell et al. 1975, Williams et al. 1995) und beim Pferd die immun-medierte Keratitis (IMMK) zu nennen (Brooks et al. 2017). Bei Katzen wird bezüglich den zwei verschiedenen immun-vermittelten Hornhauterkrankungen eosinophile Keratitis und chronische stromale Keratitis vermutet, dass sie Spätfolgen einer Infektion mit den Felinen Herpesvirus 1 sind (Nassisse 1990, Andrew 2008).

In der veterinärophthalmologischen Forschung gibt es Bemühungen, mittels Nachweis von Antikörpern in der pathologisch veränderten Hornhaut den Beweis einer immun-vermittelten Ätiologie zu erbringen (Eichenbaum et al. 1986; Pate et al. 2012, Braus et al. 2017). Im nachfolgenden Abschnitt wird erläutert, welche Rolle Antikörpern, Synonym für Immunglobuline, im Immunsystem zukommt.

1. 3. Das humorale Immunsystem und Immunglobuline

Das Immunsystem kann funktionell in eine angeborene und erworbene Immunität bzw. in ein zelluläres und humorales Immunsystem unterteilt werden (Göbel und Kaspers 2010). Das humorale Immunsystem ist weiter unterteilbar in einen unspezifischen Teil, zu dem Proteine der Akute-Phase-Reaktion, das Komplementsystem, Zytokine, Defensine und Lysozyme gehören, und einen spezifischen Teil, den die Antikörper ausmachen (Göbel und Kaspers 2010, English und Gilger 2021). Alle Bestandteile des humoralen Immunsystems sind wasserlöslich, daher im Blutserum sowie im Extrazellulärraum präsent; letzterer umfasst sowohl die Flüssigkeiten der Körperhöhlen als auch den Extrazellulärraum im Gewebe der Organe (Göbel und Kaspers 2010). Die Aufgabe des humoralen Immunsystems besteht in der Initiierung von Immunreaktionen. Den von B-Lymphozyten produzierten Antikörpern kommt insbesondere die Aufgabe zu, nach Kontakt mit einem zuvor als fremd erkannten Antigen Immunreaktionen auszulösen (Göbel und Kaspers 2010).

Es werden fünf Klassen von Antikörpern mit verschiedenen Eigenschaften und Aufgaben unterschieden (Göbel und Kaspers 2010). Im Hinblick auf die vorliegende Studie wird im Folgenden nur auf relevante Charakteristika der Klassen Immunglobulin G (IgG), IgM sowie IgA eingegangen und für weitere Informationen über diese als auch über IgE sowie IgD auf die einschlägige Literatur verwiesen. Die nachfolgenden Größen- und Mengenangaben beziehen sich auf den Menschen, sind jedoch mit denen beim Tier vergleichbar (Pain 1963, Lamm und Small

1966, <https://www.agrisera.com/en/info/molecular-weight-and-isoelectric-point-of-various-immunoglobulins.html>, Zugriff 17.03.2022). IgG hat ein Molekulargewicht von 150 kDa (Edelman et al. 1969, Berg et al. 2007), weist mit Abstand die höchste Konzentration aller Antikörper im Blutserum von 12 mg/ml^{-1} auf, dient u.a. der Immunabwehr im Extrazellulärraum gegen Bakterien und Viren und vermag das Komplementsystem zu aktivieren (Berg et al. 2007). IgM stellt ein wesentlich größeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 950 kDa dar und ist in der Frühphase von Infektionen für die erste Abwehr gegen Mikroorganismen im Blut zuständig, wo es eine Konzentration von 1 mg/ml^{-1} erreicht (Berg et al. 2007). IgA weist als Monomer ein Molekulargewicht von 170 kDa auf (Cohen und Milstein 1967) und erreicht eine Blutserumkonzentration von 3 mg/ml^{-1} , während es auf Schleimhäuten sowie im Tränenfilm als sekretorisches Dimer mit bis zu 500 kDa präsent ist (Berg 2007). Da die Hornhaut kaum Vertreter des zellulären Immunsystems enthält und das Hornhautstroma reich an extrazellulärer Matrix ist (España und Birk 2020), hat es umfassende Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern in der Hornhaut gegeben, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

1. 4. Immunglobuline in der menschlichen und tierischen Hornhaut

Nachdem bereits 1932 die Entdeckung gemacht wurde, dass die Hornhaut Proteine aus dem Blut enthält (Krause et al. 1932), gelang erst später der Nachweis von IgG-Antikörpern aus kornealem Flüssigkeitsextrakt (Kawerau und Ott 1961). Studien zur Verteilung und Diffusion von Hämoglobin und Serumalbumin legten den Grundstein für die Annahme, dass wasserlösliche Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 500 kDa aus den limbalen Blutgefäßen zentripetal in das Hornhautstroma diffundieren können (Maurice et al. 1957, Maurice et al. 1965). Die Diffusionsrate und das Verteilungsmuster der Moleküle hängen dabei unter anderem vom Molekulargewicht und dadurch auch von der Verlustrate über das Epithel und Endothel ab (Maurice und Riley 1970). Dementsprechend ist das nachgewiesene Vorkommen von Immunglobulinen in der Hornhaut von Menschen und Kaninchen interpretierbar: IgM ist aufgrund seines großen Molekulargewichtes lediglich in der Hornhautperipherie nachweisbar (Allansmith und McClellan 1975), während IgG und IgA gleichförmig über das gesamte Hornhautstroma verteilt sind (Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975, Allansmith et al. 1979). IgG erreicht dabei im Hornhautstroma die Hälfte seiner Konzentration im Serum, während es bei IgA etwa ein Fünftel der Serumkonzentration ist (Allansmith und McClellan 1975). Die

errechneten Diffusionskoeffizienten für IgG im Hornhautstroma liegen zwischen 0,002 und 0,004 cm²/Tag (Allansmith et al. 1979, Osusky et al. 1993), wonach rechnerisch von einer Dauer zwischen 50 und 70 Tagen ausgegangen wird, bis ein Gleichgewicht zwischen der kornealen und der Serumkonzentration erreicht ist (Verhagen 1990, Osusky et al. 1993). Es ist hinreichend publiziert, dass es bei einer Hypergammaglobulinämie zu einer pathologischen Anreicherung von IgG-Komplexen in der Hornhaut kommt (Kawaji et al. 1980, Kremer et al. 1989, Garibaldi et al. 2005, Matoba et al. 2010). Beschrieben wurde dies beispielsweise paraneoplastisch beim Multiplen Myelom (Kleta et al. 2004) und iatrogen bei therapeutischer intravenöser Immunglobulininfusion (Viswanathan et al. 2016).

Je eine Studie zur kaninen CSK und zur equinen IMMK widmeten sich dem Antikörpernachweis in pathologisch veränderten Hornhäuten und vereinzelt gesunden Vergleichshornhäuten (Eichenbaum et al. 1986, Pate et al. 2012). Die Ergebnisse zum Antikörpervorkommen in den erkrankten Hornhäuten waren variabel und in keiner der gesunden Hornhäute konnten Antikörper nachgewiesen werden (Eichenbaum et al. 1986, Pate et al. 2012), was den oben beschriebenen Erkenntnissen über die Menschen- und Kaninchenhornhaut widerspricht.

Nach Kenntnis der Autorin existiert keine Grundlagenliteratur über das Vorhandensein und das Verteilungsmuster von Immunglobulinen in der physiologischen Hornhaut von Hund, Katze und Pferd, welche den Großteil der in der Veterinärophthalmologie behandelten Patienten darstellen. Das Wissen über eventuelle speziesspezifische Unterschiede in der Verteilung des kornealen Immunsystems könnte Rückschlüsse auf die Ätiologie von immun-vermittelten Hornhautpathologien zulassen, die sich tierartlich sehr unterschiedlich darstellen können (Andrew 2008, Brooks et al. 2017, Maggs 2018, Whitley und Hamor 2021).

Als Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Dissertationsschrift wurde IgG ausgewählt, da aus den oben genannten Studien bekannt ist, dass diese Antikörperfraktion den weitaus größten Anteil des Antikörpergehaltes von Menschen- und Kaninchenhornhäuten ausmacht (Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975, Verhagen 1990).

1. 5. Immunhistochemischer Nachweis von IgG in der Hornhaut

In der Literatur sind verschiedene Methoden zum Nachweis von Immunglobulinen in der Hornhaut verwendet worden. Für den quantitativen Nachweis von Antikörpern und die Diffusionsexperimente wurde Flüssigkeitsextrakt aus Hornhäuten analysiert; zur Unterscheidung zentraler versus peripherer Anteile wurde die Hornhaut zuvor in verschiedene Abschnitte unterteilt

(Kawerau und Ott 1961, Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975). Zur semiquantitativen Bestimmung der Antikörperverteilung in den verschiedenen Hornhautschichten eignen sich diverse immunhistochemische Nachweismethoden; die meisten Studien verwendeten direkte oder indirekte Immunfluoreszenz bei lyophilisierten Hornhäuten (Allansmith et al. 1969, Allansmith et al. 1979, Eichenbaum et al. 1986, Pate et al. 2012).

Als Nachweismethode wurde für diese Dissertationsstudie eine automatisierte chromogene Immunhistochemie ausgewählt, da diese zum Einsatz bei standardisiert in Formalin fixierten Hornhäuten geeignet ist und somit auch die Untersuchung pathologisch veränderter Proben erlaubt, welche unter klinischen Bedingungen gewonnen werden (insbesondere im Rahmen einer lamellären Keratektomie). Zur genauen Beschreibung der Methodik wird auf die Publikation verwiesen.

1. 6. Fragestellung

Das primäre Ziel dieser Dissertationsstudie ist die Untersuchung des physiologischen IgG-Gehaltes gesunder Hornhäute von Pferden, Hunden und Katzen. Dies beinhaltet die Darstellung von IgG-Antikörpern im Hornhautgewebe mittels automatisierter chromogener Immunhistochemie und die semiquantitative Auswertung der Signalausprägung hinsichtlich Vorhandensein und Verteilungsmuster. Als weitere Zielsetzung soll der Einfluss von Tierart, Alter und Geschlecht auf die Signalausprägung analysiert werden. Die zu beweisende Hypothese lautet, dass IgG-Antikörper im kornealen Stroma bei allen Tierarten konstitutiv und mit einem gleichmäßigen Verteilungsmuster vorkommen.

Zusätzlich werden im Rahmen der Verfügbarkeit pathologisch veränderte Hornhautproben untersucht, mit der Hypothese, dass deren IgG-Gehalt von dem gesunder Hornhäute abweicht.

3 Publikation


Received: 24 October 2021 | Revised: 3 January 2022 | Accepted: 14 February 2022

DOI: 10.1111/vop.12976

ORIGINAL REPORT

WILEY

Immunohistochemical staining of immunoglobulin G in healthy equine, canine, and feline corneas

Verena Maria Herb¹  | Angelika Url² | Alexander Tichy³ | Barbara Nell¹

¹Department of Companion Animals and Horses, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

²Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

³Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

Correspondence

Verena Maria Herb, Small Animal Surgery, Ophthalmology Service, Veterinary University of Vienna, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria.

Email: verena.herb@vetmeduni.ac.at

Abstract

Objective: Establishing an immunohistochemical approach for semi-quantitative assessment of the presence of immunoglobulin G (IgG) in equine, canine, and feline corneas.

Procedures: Healthy corneas of horses, dogs, and cats, euthanized because of a fatal disease or an unrecoverable trauma unrelated to and without a history of ophthalmic disease were formalin-fixed, paraffin-embedded, and determined to be pathomorphologically healthy by light microscopy. Automated immunohistochemistry was performed using primary antibodies against IgG, biotin-conjugated secondary antibodies, and streptavidin-peroxidase, as well as diaminobenzidine for visualization. After counterstaining with hematoxylin, epithelium, stroma, Descemet's membrane (DM), and endothelium were semi-quantitatively scored for the presence of IgG on a 4-grade scale (0 = no, 1 = faint, 2 = medium, 3 = strong staining) by light microscopy.

Results: Corneal specimens of 20 horses (40 eyes) with a median age of 15.5 years (range 2–31 years), 12 dogs (21 eyes) with a median age of 10.0 years (range 4–16), and 13 cats (24 eyes) with a median age of 10.0 years (range 2–18) were included in the study. Different sexes and breeds were represented. In all corneas (100%), significant medium signal intensity in the stroma was observed. Variable immunosignal was obtained in epithelium, DM, and endothelium.

Conclusion: This method reproducibly allows for the detection of IgG in healthy equine, canine, and feline corneas, particularly stroma. Semi-quantitative results evidence medium presence of IgG in the corneal stroma. Further research is needed to evaluate IgG presence in diseased corneas.

KEYWORDS

canine, cornea, equine, feline, immunoglobulin G, immunohistochemistry

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Veterinary Ophthalmology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American College of Veterinary Ophthalmologists.

1 | INTRODUCTION

The cornea normally is a clear and avascular tissue containing only few antigen presenting cells.^{1,2} Since the corneal stroma contains abundant extracellular matrix suitable for diffusion of small soluble proteins,^{3,4} it is conceivable that the humoral immune system might play a role in initiating immune-mediated processes. Yet, the question whether immunoglobulins are constitutively present in the corneas of our domestic animal patients has been a neglected topic in veterinary basic research so far.

The presence of blood proteins including albumin and globulins was discovered by Krause within normal ox corneas as early as 1932, and subsequent protein analyses of fluid extract from the healthy corneal stroma of ox, pig, and man corroborated his findings.⁵⁻⁷ This led to thorough characterization of the soluble protein content of healthy rabbit and human corneas, confirming immunoglobulins as a normal constituent of the corneal stroma by quantitative and immunohistochemical approaches.⁸⁻¹¹ Although all 5 immunoglobulin classes are present in the stroma, immunoglobulin G (IgG) makes up the largest share, being proportionally overrepresented to the other immunoglobulins compared with serum and other ocular tissues.⁹⁻¹¹ In fact, the lapine and human cornea contain the highest IgG levels of the entire eye including tears and aqueous humor under non-pathological circumstances.¹²

Diffusion experiments in rabbit corneas identified the limbal blood vessels as the most likely source of IgG.⁸ With a molecular weight of 150 000 daltons,¹³⁻¹⁵ it slowly diffuses centripetally with negligible losses across the epithelium and endothelium,^{9,16} reaching an equilibrium at about half of the serum concentration after 50–70 days.^{10,17} Its uniform distribution throughout the stroma from Bowman's membrane to Descemet's membrane barely differs in the central versus peripheral region,^{9,11} with a linear immunohistochemistry staining pattern, parallel to the epithelium and along the stromal collagen fibers.⁹ The variance of corneal IgG content under pathological circumstances is not well understood. The fixed negative charges represented by proteoglycans (PG) and glycosaminoglycans (GAG) have been suggested to play a role,¹⁸ as well as permeability of limbal vasculature and local IgG production under inflammatory conditions.^{19,20}

Concerning the clinical significance of corneal IgG presence, a variety of studies have shown antibody-antigen-reactions²¹⁻²⁷ as well as possible local antibody production in the stroma or limbus.²⁸ Furthermore, corneal immune-complex deposition has been reported as a manifestation of systemic²⁹⁻³³ and corneal disease³⁴⁻³⁷ or after therapeutic intravenous immunoglobulin infusions.³⁸

In veterinary ophthalmic research, isolated efforts have been made to identify a correlation between the manifestation of corneal immune-mediated disease and the presence of antibodies within lamellar keratectomy samples of canine and equine corneal tissues. The immunohistochemical studies on canine chronic superficial keratitis (CSK) and equine superficial stromal immune-mediated keratitis (IMMK) did detect antibody presence in diseased corneas. However, the few healthy canine and equine corneal specimen included in the studies as control samples did not reveal any immunoglobulins.^{39,40} This is in contradiction with the evidence on rabbit and human corneas and warrants targeted studies of immunoglobulins within the healthy corneas of companion animals.

Thus, we investigated the presence and distribution of IgG within healthy equine, canine, and feline corneas using an immunohistochemical approach under standardized conditions. We hypothesized that IgG would be detectable by chromogenic immunohistochemistry and be evenly distributed throughout the corneal stroma in a similar manner in horses, dogs, and cats. The goal of this study was to provide baseline immunohistochemical staining patterns for future comparison with diseased corneas.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection

Corneal specimens were obtained at the small animal surgery and equine hospitals of the Veterinary University of Vienna during a period ranging from January 2018 until May 2020. Inclusion criteria defined horses, dogs, and cats without a history of or macroscopically evident ophthalmic disease, euthanized because of a terminal disease or an unrecoverable trauma, to be eligible. Globes were collected by enucleation within 2 h of humane euthanasia and immediately immersed in 4% buffered formaldehyde.

2.2 | Processing and immunohistochemistry

Standardized fixation took place overnight at room temperature for no shorter than 12 and no longer than 24 h to prevent over-fixation. Globes were then bisected in a sagittal plane to obtain a strip of equine cornea including the dorsal and ventral limbus or a sagittal ring of canine and feline cornea and sclera. Paraffin wax-embedded and hematoxylin-stained sections were used to confirm the absence of pathological changes by light microscopy. For

TABLE 1 Breed distribution

Equine breeds	Number of animals	Canine breeds	Number of animals	Feline breeds	Number of animals
Warmblood	8	Mixed breed	4	Domestic Shorthair	9
Haflinger	3	Pomeranian	2	Maine Coon	2
Icelandic	3	Standard Poodle	1	Domestic Longhair	1
Arabian	2	Fox Terrier	1	British Shorthair	1
Tinker	1	Hovawart	1		
Andalusian	1	Border Terrier	1		
Connemara	1	Chihuahua	1		
Noriker	1	American Staff. Bullterrier	1		

Both eyes of all horses were included in the study, whereas in 3 dogs and 2 cats only one eye met the inclusion criteria.

immunohistochemistry, 3–4 μm sections were placed on coated slides and dried to enhance tissue adherence.

The avidin-biotin-complex method was performed automatically on an Autostainer [Lab Vision AS 360, Thermo Scientific]. First, antigen retrieval was performed on deparaffinized and rehydrated sections by heating in citrate buffer (pH 6) [Thermo Scientific/AP-9003–125]. Incubation in H_2O_2 [UltraVision Hydrogen Peroxide Block; Thermo Scientific/AP-9003–125] served to block endogenous peroxidase, and a protein-blocking agent [UltraVision Protein Block; Thermo Scientific/AP-9003–125] was applied in order to reduce unspecific antibody binding. After application of the primary antibodies [Anti-Horse IgG F(c) goat antibody 608–1103 (dilution 1:30 000), Rockland Immunochemicals, Inc.; Anti-Dog IgG F(c) goat antibody 604–1103 (dilution 1:30 000), Rockland Immunochemicals, Inc.; Anti-Cat IgG goat F(c) antibody 602–1103 (dilution 1:50 000), Rockland Immunochemicals, Inc.] the appropriate biotinylated secondary antibody [Biotinylated anti-goat-IgG (dilution 1:300), Vector Laboratories/BA-5000] was used, followed by incubation with streptavidin-peroxidase [Streptavidin Peroxidase; Thermo Scientific/TS-060-HR] and visualization with diaminobenzidine [DAB Quanto; Thermo Scientific/TS-125-QHDX]. Subsequently, all sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted.

Signal specificity was proven by using equine, canine, and feline lymph node tissue as positive control, and proper negative controls by omitting the primary antibody as well as by using peptide blocking [Horse IgG F(c) fragment 008–0103 (dilution 1:30 000), Rockland Immunochemicals, Inc.; Dog IgG F(c) fragment 004–0103 (dilution 1:30 000), Rockland Immunochemicals, Inc.; Cat IgG F(c) fragment 002–0103 (dilution 1:50 000), Rockland Immunochemicals, Inc.] for every corneal and lymph node specimen undergoing immunohistochemical staining. If residual signal was present in peptide blocking, it

was subtracted from the signal intensity shown by the immunohistochemically stained slides to obtain a final score.

2.3 | Semi-quantitative assessment

All corneal specimens were assessed by light microscopy. The authors developed a semi-quantitative scoring system which one observer (VMH) applied to grade immunohistochemical signal intensity distinctly in corneal epithelium, stroma, Descemet's membrane (DM), and endothelium on a scale from 0 to 3 (0 = no signal, 1 = low, 2 = medium or 3 = high signal intensity). Additionally, non-uniform patterns of signal uptake within each corneal layer were recorded.

2.4 | Statistics

Descriptive statistics were used for animal-related and processing-associated data as well as signal intensity scores. Differences in signal intensity between species, eye laterality, age, or sex were performed using Chi-Square tests and Mann-Whitney U tests. The impact of age on the signal intensity was modeled by logistic regression analysis. For all statistical analyses, a p -value below 5% ($p < .05$) was seen as significant.

3 | RESULTS

3.1 | Material

Forty eyes (20 OD and 20 OS) were collected from 20 horses with a median age of 15.45 years (range: 2–31 years). The animals comprised 12 geldings (60%), 7 mares (35%), and one stallion (5%), and of the 8 breeds in total, warmbloods were overrepresented (40%; Table 1).

Twenty-one eyes (11 OD and 10 OS) were collected from 12 dogs with a median age of 10.00 years (range: 4–16 years). Neutered females ($n = 5$) were the most frequent sex, followed by neutered males ($n = 3$), intact females and intact males ($n = 2$ each). There were 8 breeds represented, with one third of the eyes stemming from mixed breed dogs (Table 1).

Twenty-four eyes (12 OD and 12 OS) were collected from 13 cats with a median age of 10.00 years (range: 2–18 years). Neutered females ($n = 5$) were the most frequent sex, followed by neutered males and intact females ($n = 4$ each). There were 4 breeds represented, with domestic short hair cats being overrepresented (9 cats; Table 1).

All corneal specimens were adequately assessable, however, on 6 equine (15%) and 2 canine (9.52%) slides there was less than one third of the corneal length (limbus to limbus) retained. In 15% of equine ($n = 6$ eyes) and 12.50% of feline slides, the endothelium was lost during processing. The endothelium was detached from DM but conserved enough to assess its signal intensity in 25% of equine ($n = 10$ eyes), 85.71% of canine ($n = 18$ eyes), and 58.33% of feline ($n = 14$ eyes) slides.

3.2 | Immunohistochemical results

Lymph node tissue (Figure 1) and peptide control samples (Figures 2 and 3) served as adequate positive and negative controls, respectively. The different corneal layers had a similar staining pattern in all species and no differences between the central versus the peripheral regions were noted. Within the stroma, signal was observed in regular, linear streaks parallel to the epithelium and reaching

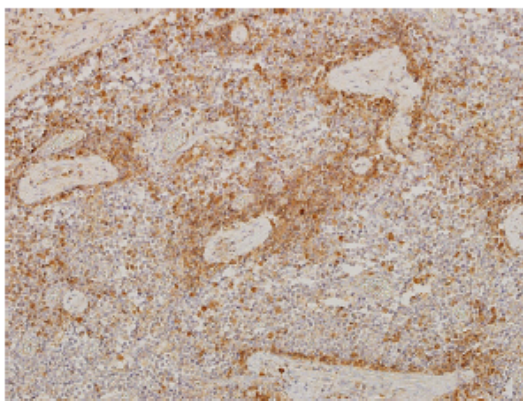


FIGURE 1 Immunohistochemically stained lymph node, serving as adequate positive control. The signal intensity represented the highest score, 3

from the epithelial basement membrane to Descemet's membrane (Figures 4, 5 and 6). While no signal could be observed within Descemet's membrane of horses (Figure 4), in over one third of dogs and over 90% of cats it did show a low signal expression, which in all but a single cat cornea was confined to half of the layer thickness adjacent to the stroma (Figure 5). The epithelium differed between species in the percentage of samples either showing a low signal intensity in a diffuse pattern or none. In 45% of horse, 28.57% of dog, and 41.67% of cat eyes, there was a low signal expression within the basal epithelial cell layers observed in peptide control slides, which in 42.5% of equine, 38.09% of canine, and 25% of feline was also present in the immunohistochemically stained slides and interpreted as an artifact (basal artifact). In 75% of equine, 100% of canine and 87.50% of feline stained slides a thin layer of immunosignaling covering superficial epithelial cells was interpreted to be another artifact (superficial artifact; Figure 5), with differing signal intensity between individuals. The endothelium generally showed some intracellular signal already in the peptide control slides in all species, therefore in every specimen a definite score thought to represent the true IgG signal was calculated by subtracting the intracellular signal intensity of the stained slides from that of the control slides.

Table 2 summarizes the semi-quantitative scores of the immunohistochemical signal for IgG in each corneal layer of horses, dogs, and cats.

3.3 | Comparative statistics

There was no statistically significant correlation of immunohistochemical signal results with eye laterality, sex, or age in any of the species ($p > .05$).

4 | DISCUSSION

This is the first study to purposefully investigate the presence of immunoglobulins in healthy corneas of horses, dogs, and cats. Immunoglobulins can generally be found in any ocular tissue that has enough extracellular space to accommodate them.¹²

Comparability of previous studies among themselves as well as with our results is limited due to different investigative approaches as well as differing tissue processing requirements for antigen detection. Some studies quantified IgG by extraction from different corneal sections to measure its concentration,^{5,10,11} whereas others detected IgG within the tissue by immunohistochemistry.^{8,18,39,40}

Limitations of this study include the small sample size and the inability to perform an ophthalmic examination

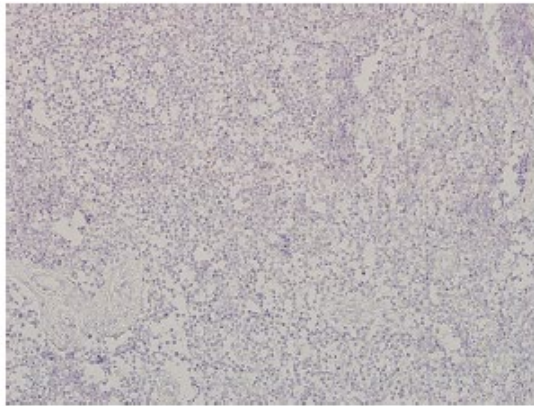


FIGURE 2 Peptide control sample of a lymph node, serving as adequate negative control. The signal intensity score was 0



FIGURE 3 Peptide control sample of an equine cornea, serving as adequate negative control. The signal intensity scores were epithelium: 0, stroma: 0, and DM: 0. The endothelium of this specimen was lost in processing

before globe collection. Nevertheless, we consider histopathological examination a reliable tool to confirm corneal health.

Our findings of IgG being invariably present in the stroma are in line with existing literature evidencing the constitutive IgG content of bovine, porcine, lapine, and human corneas.^{5,8,11} The regular, linear staining pattern we observed for IgG throughout the stroma has also been described by other studies and might be due to immunoglobulin adherence to and movement along the stromal collagen fibers.^{8,9}

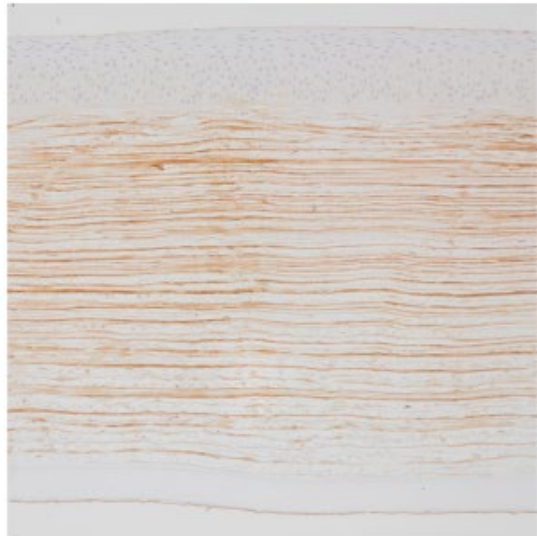


FIGURE 4 Immunohistochemically stained equine cornea. The signal intensity scores were epithelium: 0, stroma: 2, DM: 0, and endothelium: 2



FIGURE 5 Immunohistochemically stained canine cornea. The signal intensity scores were epithelium: 0 with superficial artifact: 2, stroma: 2, and DM: 0. The endothelium was detached and could not be assessed in this specimen

All previous studies described DM of healthy lapine and human corneas to be consistently devoid of IgG signal,^{8,9} which is in line with the results of our investigated equine corneas. Since it is a basement membrane with tight collagen arrangement, immunoglobulins are not expected

to be present within it, although antibody adsorption to its edge has been described.^{8,41} The fact that the half of DM adjacent to the stroma showed a signal in over one third of our canine and in over 90% of our feline specimen might have an anatomical explanation. Histologically, in humans, an anterior banded fetal layer, laid down during embryogenesis, and a posterior non-banded post-natal layer, representing the progressively thickening basement membrane of the endothelium throughout life, can be distinguished and are known to have differing collagen compositions.⁴² It is unknown whether this also holds true for horses, dogs, or cats, and a light microscopical study failed to distinguish the two layers in feline corneas.⁴³ Another explanation could be the thickness of Descemet's membrane that might have permitted partial IgG diffusion from the stroma. However, layer thickness in dogs (10–15 μm)⁴⁴ and cats (9.43 μm)⁴³ lies between that of the other species



FIGURE 6 Immunohistochemically stained feline cornea; epithelium not included in the picture. The signal intensity scores were stroma: 2, DM: 1, and endothelium: 3. Note that the signal expression in DM is concentrated on the half adjacent to the stroma

which did not display any signal (horse: 30 μm ⁴⁴; rabbit: 7–10 μm ⁴⁵; human: 5–7 μm ⁴⁶). Animal-related variables such as age or sex might have played a role, but statistical analysis failed to detect a correlation within our results.

Previous studies differed widely in their results of the immunoglobulin content within epithelium and endothelium.^{5,8,9} The scattered positive epithelial cells reported by Allansmith and colleagues (1978) in human corneas differ from our signal, which appeared rather diffuse. Comparable with our observation of a superficial artifact, the same study also described a positive signal along the anterior edge of the epithelium and the posterior edge of the endothelium.⁹

The endothelial layer provided the most variable results between species and individuals in our study. The fact that in all specimen it already showed some signal of varying intensity in the peptide blocking could possibly be attributed to a so-called “edge effect” caused by lifting of tissue borders from the slide with subsequent overexposure to the immunoperoxidase reaction.⁴⁷ Direct immunofluorescence studies on the endothelium reported no evidence of IgG signal in lapine endothelium⁸ and occasionally a positive cytoplasmic staining in human endothelial cells. The latter study also described a frequent loss of endothelium during processing.⁹ It remains unclear whether our variable results of epithelial and endothelial layers represent physiological inter-individual and interspecies variance or simply artifacts.

Previous research on the antibody content did not detect IgG within any layer of healthy canine and equine control corneas.^{39,40} In the case of Eichenbaum and colleagues' (1986) chromogenic immunohistochemistry on 14 corneoconjunctival biopsies of CSK-affected dogs and 4 healthy control biopsies, fixation took place in 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde for a minimum of 12 h.³⁹ Glutaraldehyde possesses an increased fixation rate and enhanced fixation strength compared with formaldehyde, resulting in a greater risk for over-fixation and loss of immunoreactivity in the tissue,^{48,49} and it has been found to decrease antibody penetration into fixed tissue.⁵⁰ Since Stradleigh and Ishida (2016)⁴⁹ recommend a 10-fold lower

TABLE 2 Signal intensity of IgG in immunohistochemically stained corneas

Signal intensity	Dogs <i>n</i> = 21				Cats <i>n</i> = 24				Horses <i>n</i> = 40			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Epithelium	80.95%	19.05%			41.67%	58.33%			95%	5%		
Stroma			100%				100%				100%	
DM	61.90%	38.09%			8.33%	91.67%			100%			
Endothelium	14.29%	71.43%	14.29%		37.50%	58.33%	4.17%		27.50%	27.50%	25%	5%

concentration of glutaraldehyde (0.1% in combination with 4% formaldehyde) to prevent deleterious effects on immunogenicity, the concentration and fixation time Eichenbaum and colleagues (1986) used might be partly responsible for their negative results of immunoglobulin in normal corneas and inconsistent staining in diseased specimen.^{39,51} We suspect their 1:1000 dilution of the primary antibody, being substantially lower than ours, and greater section thickness of 5 μm as opposed to 3–4 μm as potentially contributing factors to the differing results. The stromal exposure of their lamellar keratectomy samples might have caused a wash-out effect on the soluble protein content of the stroma, the same possibly being the case in Pate and colleagues' study (2012) on keratectomy samples of 10 horses with superficial stromal IMMK and one unaffected control horse. That study used a protocol of direct immunofluorescence on paraffin-embedded sections different from our chromogenic detection method and is therefore difficult to compare other than an increased section thickness of 6 μm .⁴⁰ Their negative control sample did not stain for IgG, IgM, nor IgA, while all diseased samples stained positively for all antibodies in both epithelium and stroma. Since all IMMK-specimens showed cellular infiltrate and edema, and half of them neovascularization,⁴⁰ an enhanced antibody concentration within the corneas due to vascular permeability and possible local antibody production is plausible.^{17,52,53} An insufficient sensitivity of the method to detect immunoglobulins in their normal corneal concentration would also be a possible explanation.⁴⁷ Pate and colleagues (2012)⁴⁰ described a linear stromal staining pattern for IgG, IgM, and IgA within IMMK-affected corneas that matches our own observations regarding IgG. Further studies are warranted to examine whether the corneal IgG content is changed under pathological conditions.

We conclude that IgG is constitutively present throughout the healthy equine, canine, and feline corneal stroma. Further research is needed to determine the reasons for the variable presence or intensity of signal in the corneal epithelium, DM, and the endothelium.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Petra Kodajova for performing the immunohistochemical processing.

CONFLICT OF INTERESTS

None.

ORCID

Verena Maria Herb  <https://orcid.org/0000-0001-8119-0966>

REFERENCES

1. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, et al. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:581-589.
2. Liu J, Li Z. Resident innate immune cells in the cornea. *Front Immunol.* 2021;12:620284.
3. Espana EM, Birk DE. Composition, structure and function of the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2020;198:108-137.
4. Maurice M. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol.* 1957;136:263-286.
5. Kawerau E, Ott H. The soluble proteins of the cornea. Paper and immunoelectrophoretic studies. *Exp Eye Res.* 1961;1(2):137-144.
6. Holt WS, Kinoshita JH. The soluble proteins of the bovine cornea. *Invest Ophthalmol.* 1973;12:114-126.
7. Krause AC. The chemical constitution of the cornea. *Am J Ophthalmol.* 1932;15:422-424.
8. Allansmith M, Newman L, Hutchinson DS. Immunoglobulin G in the rabbit cornea. *Arch Ophthalmol.* 1969;82:229-231.
9. Allansmith M, de Ramus A, Maurice D. The dynamics of IgG in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;18:947-955.
10. Allansmith MR, McClellan BH. Immunoglobulins in the human cornea. *Am J Ophthalmol.* 1975;80:123-132.
11. Stock EL, Aronson SB. Corneal immune globulin distribution. *Arch Ophthalmol.* 1970;84:355-359.
12. Allansmith M, Whitney CR. Immunoglobulins in the human eye. *Arch Ophthalmol.* 1973;69:36-45.
13. Cohen S, Milstein C. Structure and biologic properties of immunoglobulins. *Adv Immunol.* 1967;7:1-89.
14. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, et al. The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule. *J Biochem.* 1969;63(1):78-85.
15. Tomasi TB Jr, Zigelbaum S. Selective occurrence of $\gamma\text{-1A}$ globulins in certain body fluids. *J Clin Invest.* 1963;42(10):1552-1560.
16. Maurice DM, Watson PG. The distribution and movement of serum albumin in the cornea. *Exp Eye Res.* 1965;4(4):355-363.
17. Verhagen C, Breeboart AC, Kijlstra A. Diffusion of immunoglobulin G from the vascular compartment into a normal rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31:1519-1525.
18. Waldrep JC, Noe RL, Stulting RD. Analysis of human corneal IgG by isoelectric focusing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29:1538-1543.
19. Leibowitz HM, Elliott JH. Antibody production in corneal hypersensitivity. *Arch Ophthalmol.* 1965;73:687-695.
20. Smolin G, Hall JM. Afferent arc of the corneal immunologic reaction. II. Local and systemic response to bovine gamma-globulin. *Arch Ophthalmol.* 1973;90:231-234.
21. Aronson SB, Goodner EK, Yamamoto E, et al. Mechanism of host response in the eye. I. Changes in anterior eye following immunization to heterologous antigen. *Arch Ophthalmol.* 1965;73:402-412.
22. Aronson SB, McMaster PRB, Moore TE, et al. The pathogenesis of suture toxicity. *Arch Ophthalmol.* 1970;84:641-644.
23. Germuth FG, Maumenee AE, Pratt-Johnson J, et al. Observations on the site and mechanism of antigen-antibody interaction in anaphylactic hypersensitivity. *Am J Ophthalmol.* 1958;46(5 Pt 2):282-286.
24. Mondino B, Brown SI, Rabin BS. Corneal inflammation and complement. *Doc Ophthalmol Proc Ser.* 1979;20:11-17.

25. Morawiecki J. Precipitation in the living cornea during antigen-antibody reactions. *Doc Ophthalmol.* 1956;132:236-243.
26. Parks JJ, Leibowitz HMI, Maumenee AE. Immediate hypersensitivity reactions in the cornea of the guinea pig. *J Immunol.* 1962;89:323-325.
27. Wessely K. Über anaphylaktische Erscheinungen an der Hornhaut (Experimentelle Erzeugung einer parenchymatösen Keratitis durch artfremdes Serum.). *Münch Med Wochenschr.* 1911;58:1713-1714.
28. Schwab F. Untersuchungen über den Antikörpergehalt (Präcipitine) der Hornhaut nach gleichzeitiger Einverleibung verschiedener Antigene. *Graefes Arch Ophthalm.* 1959;160:592-627.
29. Aiello F, Congliaro P, Malaspina C, et al. Peripheral ulcerative keratitis as the primary clinical manifestation of type 2 cryoglobulinemia. *Can J Ophthalmol.* 2021;56:148-150.
30. Garibaldi DC, Gottsch J, La Cruz Z, et al. Immunotactoid keratopathy: a clinicopathologic case report and a review of reports of corneal involvement in systemic paraproteinemias. *Surv Ophthalmol.* 2005;50:61-80.
31. Kleta R, Blair SC, Bernardini I, et al. Keratopathy of multiple myeloma masquerading as corneal crystals of ocular cystinosis. *Mayo Clin Proc.* 2004;79:410-412.
32. Kremer I, Wright P, Merin S, et al. Corneal subepithelial monoclonal kappa IgG deposits in essential cryoglobulinaemia. *Br J Ophthalmol.* 1989;73:669-673.
33. Matoba AY, Chevez-Barrios P, Jones DB. Atypical corneal immunoglobulin deposition in a patient with dysproteinemia. *Cornea.* 2010;29:105-107.
34. Amemiya T, Yoshida H, Yoshida M, et al. Ocular pathology of rhino mouse. I. Ultrastructure of the cornea; a model of corneal dystrophy. *J Jpn Ophthalmol Soc.* 1977;81:1814-1821.
35. Chi H, Hao W, Qi X, et al. A proteomic approach towards understanding the pathogenesis of Mooren's ulcer. *Exp Eye Res.* 2021;205:108509.
36. Kawaji H, Ryoichi T, Nakaguchi T. Immunopathology of rhino mouse, an autosomal recessive mutant with murine Lupus-like disease. *Acta Pathol Jpn.* 1980;30:515-530.
37. Yoshida M, Amemiya T, Yoshida H, et al. Ocular pathology of rhino mouse. III. Immunohistology of the cornea - A model of corneal dystrophy. *J Jpn Ophthalmol Soc.* 1978;82:941-947.
38. Viswanathan V, Agashe P, Jain V, et al. Crystalline keratopathy due to intravenous immunoglobulin in a 12-year-old girl with Kawasaki disease. *J AAPOS.* 2016;20:466-468. e1.
39. Eichenbaum JD, Lavach JD, Gould DH, et al. Immunohistochemical staining patterns of canine eyes affected with chronic superficial keratitis. *Am J Vet Res.* 1986;47:1952-1955.
40. Pate DO, Clode AB, Olivry T, et al. Immunohistochemical and immunopathologic characterization of superficial stromal immune-mediated keratitis in horses. *Am J Vet Res.* 2012;73:1067-1073.
41. Witmer RH. Antibody formation in rabbit eye studied with fluorescein-labeled antibody. *Arch Ophthalmol.* 1955;53:811-816.
42. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25:1402-1415.
43. Bourne WM, Nelson LR, Buller CR, et al. Long-term observation of morphologic and functional features of cat endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:891-899.
44. Murphy CJ, Pollock RV. The eye. In: Evans HE, ed. *Miller's Anatomy of the Dog.* 3rd ed. WB Saunders; 1993:1009-1055.
45. Prince JH. *The Rabbit in Eye Research.* CC Thomas; 1964:84-124.
46. Duke-Elder S, Wybar KC. System of ophthalmology. Volume II. The Anatomy of the visual system. *J Med Educ.* 1961;36:1756.
47. True LD. Quality control in molecular immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol.* 2008;130:473-480.
48. Hopwood D. Fixatives and fixation: a review. *Histochem J.* 1969;1:323-360.
49. Stradleigh TW, Ishida AT. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res.* 2015;48:181-202.
50. Pow DV, Wright LL, Vaney DI. The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *J Neurosci Methods.* 1995;56:115-123.
51. Brandtzaeg P, Rognum TO. Evaluation of nine different fixatives. *Pathol Res Pract.* 1984;179:250-266.
52. Osuky R, Morell A, Imbach P, et al. Diffusion of immunoglobulins into rabbit cornea after subconjunctival injection: Experimental demonstration and mathematical model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1993;231:122-128.
53. van der Veen G, Broersma L, Bruyne I, et al. Influx of Immunoglobulins from the Vascular Compartment Into a Grafted Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:876-883.

How to cite this article: Herb VM, Url A, Tichy A, Nell B. Immunohistochemical staining of immunoglobulin G in healthy equine, canine, and feline corneas. *Vet Ophthalmol.* 2022;00:1-8. doi:[10.1111/vop.12976](https://doi.org/10.1111/vop.12976)

3 Erweiterte Resultate

Nachdem in der Publikation die gesunden Hornhäute ausgewertet wurden, werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der pathologisch veränderten Hornhäute beschrieben. Es standen pathologisch veränderte Hornhautproben von fünf Pferden, acht Hunden und zehn Katzen zur Verfügung, die nach dem gleichen Protokoll wie die gesunden untersucht wurden. Die Altersspanne der Pferde reicht von 0,6 bis 24,9 Jahre, die der Hunde von 5,3 bis 15,9 Jahre und die der Katzen von 0,5 bis 18,8 Jahre. Von den insgesamt 23 erkrankten Hornhäuten stammen 17 von Augen, die entweder aufgrund einer klinischen Indikation *intra vitam* oder bei aufgrund von nicht-okulären Ursachen euthanasierten Tieren *post mortem* enukleiert wurden. Die restlichen sechs sind lamelläre Keratektomieproben des Epithels und oberflächlichen Hornhautstromas, welche im Zuge einer klinisch indizierten Operation gewonnen wurden. Die Proben wurden anhand der verschiedenen und variabel stark ausgeprägten Hornhautpathologien in vier Kategorien unterteilt. Die Beurteilung der Signalintensität in den einzelnen Hornhautschichten erfolgte deskriptiv nach der gleichen 4-Punkte-Skala (0=kein Signal, 1=geringgradige, 2=mittelgradige, 3=hochgradige Signalintensität) wie bei den gesunden Hornhäuten. Sofern in den Peptidkontrollen Signal vorhanden war, wurde dies von den immunhistochemisch gefärbten Proben abgezogen und so die finale Signalintensität erhalten, die in den folgenden Ergebnistabellen aufgeführt wird. Zur Illustrierung der Signalintensität werden pro Kategorie für einen Beispielfall Abbildungen beigefügt. Bei der Interpretation ist zu bedenken, dass kein direkter Vergleich der Signalintensität zwischen diesen Abbildungen möglich ist, da die Beurteilung stets von der jeweiligen Positiv- und Negativkontrolle eines jeden immunhistochemischen Durchganges abhängig ist.

In Kategorie 1 wurden acht Augen mit mittel- bis hochgradig entzündlichen, ulzerativen Hornhautpathologien aufgenommen. Sie stammen von drei Pferden und fünf Hunden und umfassen ein Kollagenaseulkus, einen Hornhautabszess, fünf Hornhautperforationen sowie ein Hornhautulkus bei einem Sekundärglaukom mit korneal adhärenter prä-iridaler fibrovaskulärer Membran (PIFM). Wie Tab. 2 zu entnehmen ist, stellt sich die Signalintensität im Bereich der Läsion in 6/8 Fällen beim Epithel, in 4/8 Fällen beim Stroma und in 1/8 Fällen beim Endothel abweichend von der nicht in das Krankheitsgeschehen involvierten Hornhaut dar. Die Signalintensität des Epithels reicht von 0 bis 2, die des Stromas von 1–2 bis 3, die der Descemet-Membran von 0 bis 1 und die des Endothels

von 1 bis 3. Als Beispiel für Kategorie 1 wird die Signalintensität des Hundes H4 in Abb. 1 und 2 dargestellt.

Tab. 2. Kategorie 1: mittel- bis hochgradig entzündliche, ulzerative Hornhautpathologien.

Nr.	Tierart, Rasse	Alter	Geschlecht	Auge	Diagnose	Signalintensität gesamt vs. Läsion (falls abweichend)			
						Epithel	Stroma	Descemet- Membran	Endothel
P1	Pferd, Warmblut	3,8 Jahre	Stute	OD	Traumatische Hornhautperforation	2	2–3	0	1
P2	Pferd, Vollblut	24,3 Jahre	Wallach	OD	Hornhautabszess	1 vs. 2	2–3	0	3
P3	Pferd, Vollblut	24,9 Jahre	Wallach	OD	Perforiertes Hornhautulkus	0	2 vs. 2–3	0	3
H1	Hund, Siberian Husky	5,3 Jahre	weiblich	OD	Hornhautperforation	0 vs. 1	2	0	2
H2	Hund, Franz. Bulldogge	8,3 Jahre	männlich	OS	Kollagenaseulkus	1 vs. 2	2–3	1 (stromal zugewandte Hälfte)	2
H3	Hund, Mops	10,1 Jahre	weiblich kastriert	OD	Hornhautperforation	1 vs. 2	2 vs. 3	0	2 vs. 3
H4	Hund, Tibet Spaniel	15,9 Jahre	männlich kastriert	OD	Hornhautperforation	1 vs. 2	2 vs. 2–3	1	3
H5	Hund, Franz. Bulldogge	6,5 Jahre	männlich kastriert	OS	Hornhautulkus, Sekundärglaukom mit korneal adhärenter PIFM	1 vs. 1-2	1–2 vs. 3	1 (endoth. zugewandte Hälfte)	2 (teilw. von PIFM bedeckt)



Abb. 1. Immunhistochemische Färbung der Hornhautperipherie des Hundes H4. Das Epithel befindet sich links oben, das Endothel rechts unten im Bild. Das Epithel weist eine Signalintensität von 1 auf; aufgelagert ist ein Randartefakt der Intensität 3 sichtbar. Das Signal im Stroma beträgt 2 und zeigt ein paralleles, lineares Muster; subepithelial grenzt die Signalintensität im Bereich von kornealen Blutgefäßen an 3. Die Descemet-Membran weist ein Signal der Intensität 1 in ihrer gesamten Dicke auf und für das Endothel beträgt die Signalintensität 3. 10fache Vergrößerung.

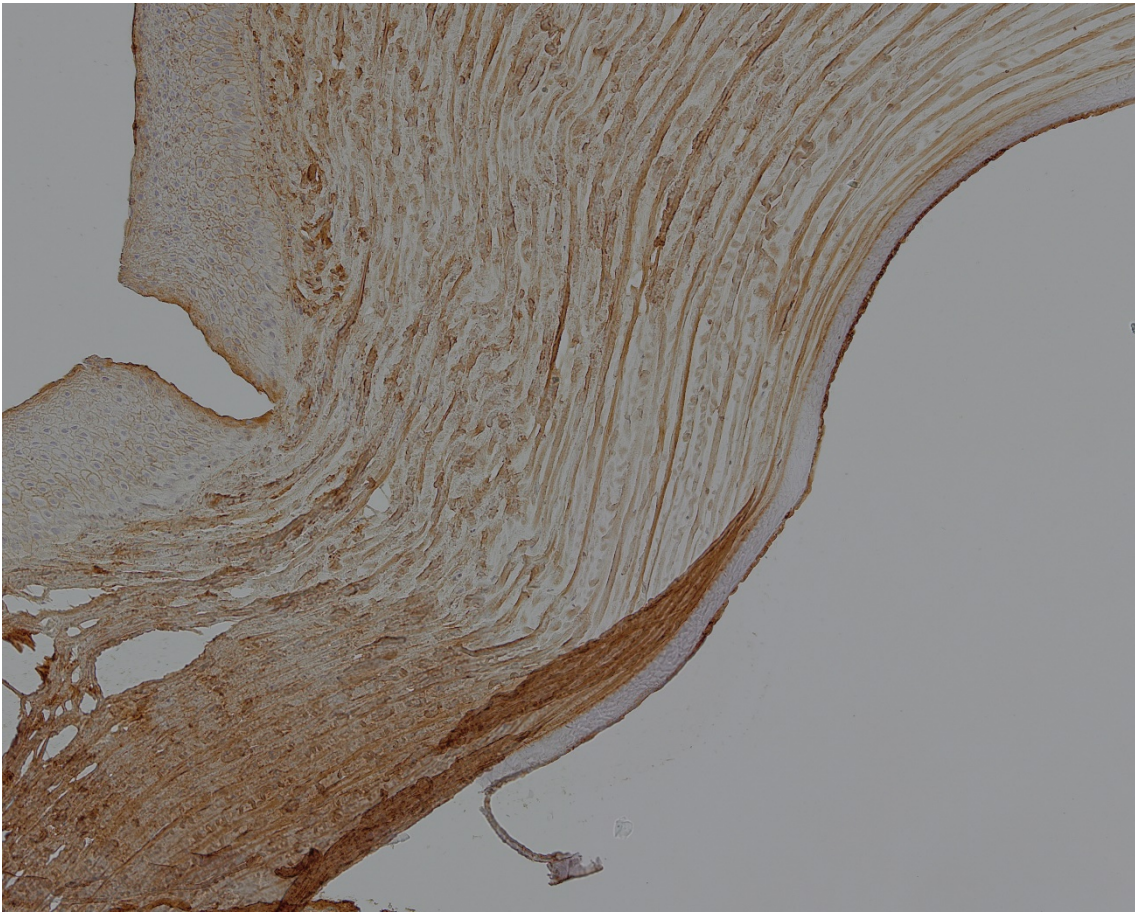


Abb. 2. Immunhistochemische Färbung der Hornhaut des Hundes H4 direkt angrenzend an die Hornhautperforation. Das Epithel befindet sich links oben, das Endothel rechts unten im Bild. Das Epithel weist hier eine Intensität von 2 auf und das Randartefakt ist dünner. Im Stroma beträgt die Intensität 2–3 und ist abweichend vom linearen Muster; am stärksten ist die Intensität im Bereich von zellulärer Infiltration sowie kollagenolytischen Stromas. Die Signalintensität von Descemet-Membran und Endothel beträgt, wie auch in der Hornhautperipherie, jeweils 1 und 3. 10fache Vergrößerung.

In Kategorie 2 wurden zwei Augen mit geringgradig entzündlichen, ulzerativen Hornhautpathologien aufgenommen. Sie stammen von zwei Katzen und umfassen ein Auge mit Keratokonjunktivitis sicca sowie einem verheilten Kollagaseulkus und ein chronisches expositionsbedingtes Hornhautulkus. Wie Tab. 3 zu entnehmen ist, stellt sich die Signalintensität im Bereich der Läsion in 1/2 Fällen beim Stroma abweichend von der umgebenden Hornhaut dar. Die Signalintensität des Epithels reicht von 1–2 bis 2, die des Stromas von 2 bis 3, die der Descemet-Membran beträgt in beiden Fällen 0 bis 1 und die des Endothels 1 bis 2. Als Beispiel für Kategorie 2 wird die Signalintensität der Katze K1 in Abb. 3 dargestellt.

Tab. 3. Kategorie 2: geringgradig entzündliche, ulzerative Hornhautpathologien.

Nr.	Tierart, Rasse	Alter	Geschlecht	Auge	Diagnose	Signalintensität gesamt vs. Läsion (falls abweichend)			
						Epithel	Stroma	Descemet- Membran	Endothel
K1	Katze, Europäisch Kurzhaar	18,8 Jahre	weiblich kastriert	OS	Verheiltes Kollagenaseulkus, Keratokonjunktivitis sicca	2	2–3	0	2
K2	Katze, Europäisch Kurzhaar	7,7 Jahre	männlich kastriert	OD	Chronisches Hornhautulkus, expositionsbedingt	1–2	2 vs. 3	0	1



Abb. 3. Immunhistochemische Färbung der Hornhaut der Katze K1. Das Epithel befindet sich rechts, das prozessierungsbedingt abgelöste Endothel links im Bild. Im Bereich des verheilten Kollagenaseulkus (oben im Bild) ist das Epithel dünn und unregelmäßig; im Stroma ist in mittlerer Tiefe zelluläres Infiltrat erkennbar. Die Signalintensität für das Epithel beträgt 2 (Randartefakt 3), die des Stromas 2–3, die der Descemet-Membran 0 und die des Endothels 2 (nach Subtraktion des vorhandenen Signals der Intensität 1 in der Peptidkontrolle). Im Stroma

ist das lineare Muster im Bereich des verheilten Kollagenaseulkus sowie peripher im subepithelial gequollenen Stroma aufgehoben; am stärksten ist die Intensität im Bereich des zellulären Infiltrats. 10fache Vergrößerung.

In Kategorie 3 wurden sieben Augen mit geringgradigen, nicht-ulzerativen kornealen Veränderungen begleitend zu anderen okulären Pathologien aufgenommen. Sie stammen von einem Pferd, zwei Hunden und vier Katzen. Sie umfassen zwei Prolapsus bulbi, zwei Skleralrupturen, eine Keratitis pigmentosa nach alter Hornhautperforation mit anteriorer Synechie und maturer Katarakt sowie zwei Sekundärglaukome. Wie Tab. 4 zu entnehmen ist, stellt sich die Signalintensität im Bereich der Läsion (sofern vorhanden) nur in 1/7 Fällen beim Endothel abweichend von der umgebenden Hornhaut dar. Die Signalintensität des Epithels beträgt 0 (bei 1/7 Proben kam die Epithelschicht im Zuge der Prozessierung abhanden), die des Stromas von 2 bis 2–3, die der Descemet-Membran von 0 bis 1 und die des Endothels von 0 bis 2. Als Beispiel für Kategorie 3 wird die Signalintensität des Hundes H7 in Abb. 4 dargestellt.

Tabelle 4. Kategorie 3: geringgradige, nicht-ulzerative korneale Veränderungen begleitend zu anderen okulären Pathologien.

Nr.	Tierart, Rasse	Alter	Geschlecht	Auge	Diagnose	Signalintensität gesamt vs. Läsion (falls abweichend)			
						Epithel	Stroma	Descemet- Membran	Endothel
P4	Pferd, Appaloosa	23,9 Jahre	Stute	OS	Sekundärglaukom, entzündl. stromale Infiltration	0	2	0	1 vs. 0
H6	Hund, Pekingese	6,0 Jahre	männlich	OS	K. pigmentosa, alte Perforation, anteriore Synechie, mature Katarakt	0	2–3	0	2
H7	Hund, Shiba	10,8 Jahre	männlich kastriert	OS	K. pigmentosa, Sekundärglaukom, Lux. lentis ant.	0	2	1 (stromal zugewandte Hälfte)	1
K3	Katze, Europäisch Kurzhaar	9,0 Jahre	weiblich	OS	Skleralruptur	0	2	0	1
K4	Katze, Britisch Kurzhaar	4,5 Jahre	männlich kastriert	OD	Bulbusprolaps	0	2	0	0
K5	Katze, Europäisch Kurzhaar	1,8 Jahre	weiblich kastriert	OD	Bulbusprolaps	nicht beur- teilbar	2	0	1
K6	Katze, Europäisch Kurzhaar	11,8 Jahre	männlich kastriert	OD	Skleralruptur	0	2	0	2

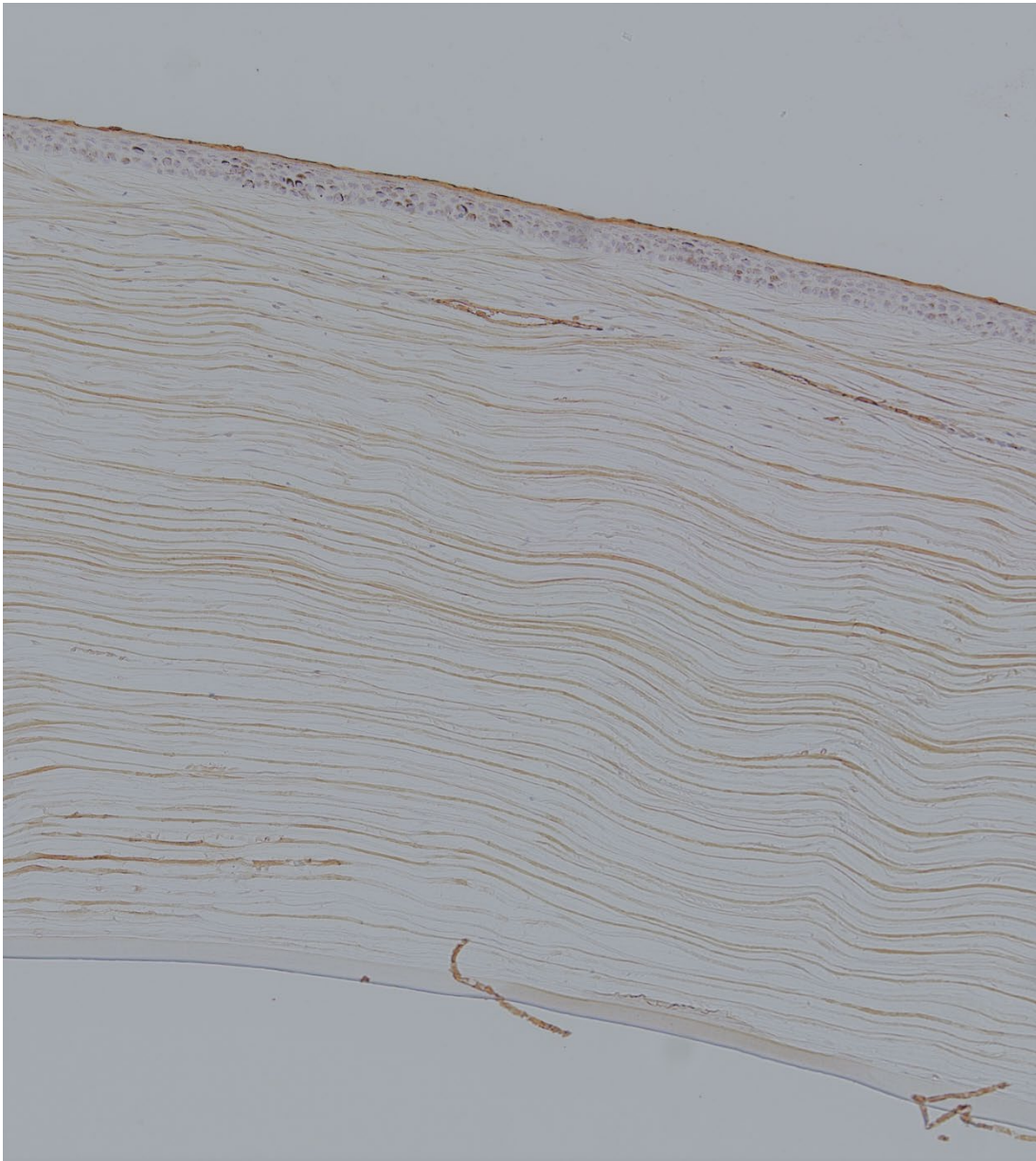


Abb. 4. Immunohistochemische Färbung des Hundes H7. Das Epithel befindet sich oben, das prozessierungsbedingt abgelöste Endothel unten im Bild. Die Signalintensität des Epithels beträgt 0 (Randartefakt 3), die des Stromas 2, die der Descemet-Membran 1 (in der dem Stroma zugewandten Hälfte der Dicke) und die des Epithels 1 (nach Subtraktion der Signalintensität von 2 in der Peptidkontrolle). Im Epithel sind dunkelbraune Melaningranula enthalten und im oberflächlichen Stroma Blutgefäße vorhanden (Signalintensität 3 in den Lumina), vereinbar mit einer Keratitis pigmentosa. 10fache Vergrößerung.

In Kategorie 4 wurden sechs lamelläre Keratektomieproben von Augen mit oberflächlich-stromalen Hornhautpathologien aufgenommen, bei denen eine Operation klinisch indiziert war. Sie stammen von einem Pferd, einem Hund und vier Katzen. Sie umfassen eine traumatische Hornhautlazeration, eine kristalline Keratopathie sowie vier Schwarze Hornhautnekrosen. Die pathologisch veränderten Keratektomieproben umfassten in 6/7 Fällen Epithel und Stroma (bei 1/7 Fällen war das Stroma jedoch nicht beurteilbar) und in 1/7 Fällen nur Stroma. Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, reicht die Signalintensität des Epithels von 0 bis 2 und die des Stromas von 1–2 bis 2–3. Als Beispiel für Kategorie 4 wird die Signalintensität der Katze K9 in Abb. 5 dargestellt.

Tab. 5. Kategorie 4: lamelläre Keratektomieproben.

Nr.	Tierart, Rasse	Alter	Geschlecht	Auge	Diagnose	Signalintensität Läsion			
						Epithel	Stroma	Descemet-Membran	Endothel
P5	Pferd, Quarter Horse	0,6 Jahre	Hengst	OD	Traumatische Hornhautlazeration	1	nicht beurteilbar	/	/
H8	Hund, Mischling	15,3 Jahre	männlich kastriert	OD	Kristalline Keratopathie	1	2–3	/	/
K7	Katze, Britisch Kurzhaar	5,0 Jahre	weiblich kastriert	OD	Schwarze Hornhautnekrose	/	1–2	/	/
K8	Katze, Perser	7,8 Jahre	männlich kastriert	OS	Schwarze Hornhautnekrose	0	2–3	/	/
K9	Katze, Perser	3,8 Jahre	weiblich kastriert	OS	Rezidiv Schwarze Hornhautnekrose	2	2–3	/	/
K10	Katze, Sphynx	0,5 Jahre	männlich	OS	Schwarze Hornhautnekrose	0	1–2	/	/

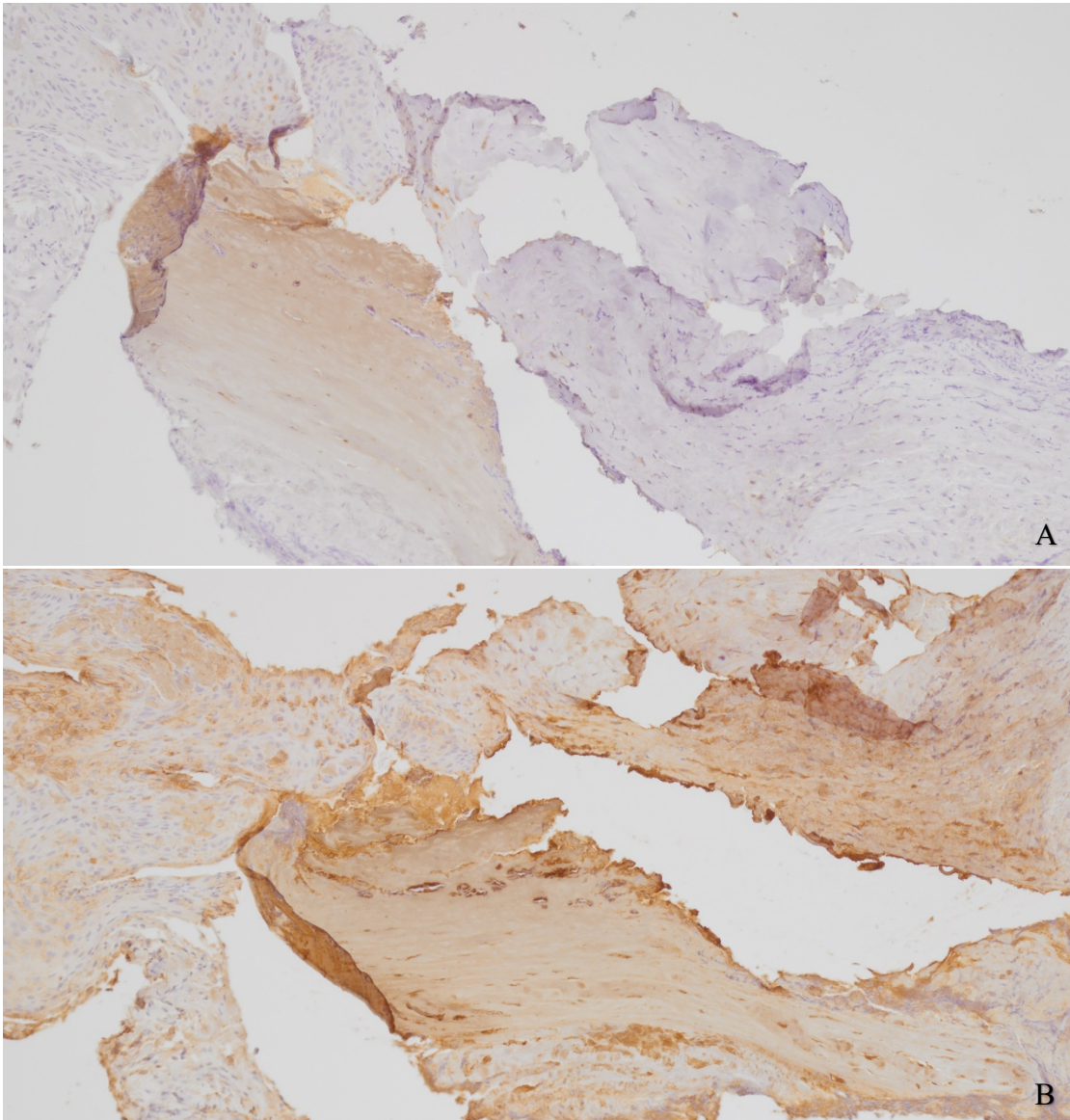


Abb. 5 A und B. Lamelläre Keratektomieprobe der rezidierten Schwarzen Hornhautnekrose von Katze K9 in der Peptidkontrolle (A) und immunhistochemischen Färbung (B). In der partiell zerfallenen Probe ist links das Epithel, mittig die Nekrose und rechts das fibrotische, desorganisierte Stroma sichtbar. Die Signalintensität des Epithels beträgt 2 und die des Stromas 2–3 ohne lineares Muster. Im Bereich der Nekrose kommt es vor allem entlang der Geweberänder, die artifiziell durch den Zerfall der Probe entstanden sind, zu einer Signalanreicherung, vereinbar mit einem Randartefakt der Signalintensität 3. 10fache Vergrößerung.

4 Erweiterte Diskussion

4. 1. Gesunde Hornhäute

Die vorliegende Dissertationsstudie konnte mittels chromogener Immunhistochemie nachweisen, dass IgG konstitutiv im Hornhautstroma von Hund, Katze und Pferd präsent ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Untersuchungen des Immunglobulingehaltes der Hornhaut beim Rind (Krause 1932, Kawerau und Ott 1961, Holt und Kinoshita 1973), Schwein (Kawerau und Ott 1961), Kaninchen (Allansmith et al. 1969, Verhagen 1990) und Menschen (Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975, Allansmith et al. 1978, Allansmith et al. 1979, Waldrep et al. 1988). Das in dieser Studie bei den gesunden Hornhäuten von Hund, Katze sowie Pferd beobachtete gleichmäßige Verteilungsmuster im Stroma, von Limbus zu Limbus und von Epithel zu Descemet-Membran, ist aus Studien zur IgG-Verteilung bekannt (Allansmith et al. 1969, Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975, Allansmith et al. 1978, Allansmith et al. 1979) und scheint bei allen diesbezüglich untersuchten Spezies identisch zu sein. Dies entspricht der durch Diffusionsstudien bewiesenen Hypothese, dass IgG, wie andere Serumproteine (Maurice 1957, Maurice und Watson 1965), aus den Blutgefäßen am Limbus entlang eines Konzentrationsgradienten in die Hornhaut diffundiert (Stock und Aronson 1970, Allansmith et al. 1978, Verhagen 1990, Osusky et al. 1993). Sein Molekulargewicht von 150 kDa (Edelman et al. 1969, Berg et al. 2007) bedingt, dass es während der Diffusion nur zu geringen Verlusten über Epithel oder Descemet-Membran und Endothel kommt (Maurice und Riley 1970), weshalb sich IgG bis ins Hornhautzentrum und somit im gesamten Stroma anreichern kann (Allansmith und McClellan 1975, Allansmith et al. 1979). Das Signalmuster, welches in der vorliegenden Studie als linear und parallel zum Verlauf der stromalen Kollagenfasern beobachtet wurde, deckt sich ebenfalls mit den Literaturbeschreibungen (Allansmith et al. 1969, Yoshida et al. 1978, Allansmith et al. 1979, Pate et al 2012) und könnte mit einer Adhärenz von IgG an die Kollagenfasern erklärt werden (Eichenbaum et al. 1986).

Die Resultate zum gesunden Epithel und Endothel in dieser Studie gestalteten sich sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Tierarten variabel, wobei keine Korrelation mit Alter oder Geschlecht festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zum Stroma wiesen Epithel und Endothel teilweise in den Negativkontrollen ein Signal auf, dessen Intensität von der des Signals in der immunhistochemisch gefärbten Probe subtrahiert wurde, um den Endwert für die deskriptive Statistik zu erhalten. Das Signal in der Negativkontrolle ist als unspezifisch für IgG zu

bewerten. In der Literatur sind ebenfalls sehr variable Resultate zum physiologischen IgG-Gehalt dieser Hornhautschichten zu finden (Kawerau und Ott 1961, Allansmith et al. 1969, Allansmith et al. 1978, Allansmith et al. 1979). Die Arbeit von Allansmith und Kollegen (1979) zur menschlichen Hornhaut verwendete direkte Immunfluoreszenz und beschrieb das Vorhandensein vereinzelter signaltragender Epithel- und Endothelzellen (Allansmith et al. 1979). In der vorliegenden Studie hingegen stellte sich das Signal im Epithel diffus dar, und es war jeweils das Endothel als Ganzes bzw. alle Endothelzellen signaltragend. Eine Studie zu Kaninchenhornhäuten konnte mittels direkter Immunfluoreszenz jedoch kein Signal im Endothel feststellen (Allansmith et al. 1969). Es wäre möglich, dass diese Unterschiede tatsächlich aus bisher unbekanntem Gründen eine physiologische Varianz des IgG-Gehaltes dieser Hornhautschichten innerhalb und zwischen den Tierarten darstellen. Andererseits könnten technische Faktoren, wie beispielsweise die Sensitivität des jeweiligen Protokolles (Allansmith et al. 1979) oder Details in der technischen Ausführung (Bogen et al. 2009), dafür verantwortlich sein.

Das in dieser Studie teilweise beobachtete Signal in einer dünnen Schicht entlang der Epitheloberfläche deckt sich mit der Beschreibung von Allansmith und Kollegen (1978), welche zudem von einer Signalschicht entlang der Endothelinnenfläche berichteten. Es könnte sich dabei theoretisch um Auflagerungen von IgG aus Tränenfilm oder Kammerwasser handeln (Allansmith et al. 1978), was angesichts der viel geringeren Konzentration des Globulins in diesen Flüssigkeiten als im Serum (Allansmith et al. 1973, McClellan et al. 1973, Allansmith und McClellan 1975) jedoch unwahrscheinlich erscheint. Vereinbar wäre diese Signalanreicherung vielmehr mit dem beschriebenen Phänomen eines Randartefaktes (True 2008). Dieses entsteht durch Abheben der Gewebeschnittränder vom Objektträger, wodurch diese gegenüber der Immunperoxidase-reaktion überexponiert werden (True 2008). Es wäre denkbar, dass es sich bei dem Signal, das auch in den Peptidkontrollen teilweise als dünne Schicht das Epithel bedeckt, ebenfalls um ein Randartefakt handeln könnte.

Eine separate Diskussion erfordern die Ergebnisse der Descemet-Membran. Beim Pferd konnte in dieser Hornhautschicht kein Signal festgestellt werden, was sich mit den Ergebnissen aus der Literatur deckt (Allansmith et al. 1969, Allansmith et al. 1979). Dieses Resultat entspricht der Annahme, dass es sich bei der Schicht um eine Basalmembran handelt, in der aufgrund des dichten Kollagengeflechtes (Jakus 1956) kein Extrazellulärraum mit Platz für Immunglobuline zu erwarten wäre. In zwei Studien wurde beschrieben, dass eine dünne Signalschicht an die Membran angelagert war, und als Antikörperadsorption an den Rand der Membran interpretiert (Witmer

1955, Allansmith et al. 1969). Nichtsdestotrotz weisen in der vorliegenden Studie ein Großteil der Katzen- und ein Drittel der Hundehornhäute ein Signal innerhalb der Descemet-Membran auf, das nicht mit dem Alter oder Geschlecht der Tiere korreliert. Die Dicke der Descemet-Membran scheint als Erklärungsansatz ungeeignet, da diese bei Katze und Hund zwischen der dünneren von Mensch sowie Kaninchen und der dickeren vom Pferd liegt (Tab. 6).

Tab. 6. Vergleich der speziesspezifisch unterschiedlichen Dicke der Descemet-Membran von Mensch, Kaninchen, Hund, Katze und Pferd.

Mensch	Kaninchen	Katze	Hund	Pferd
5–7 µm (Duke-Elder und Wybar 1961)	7–10 µm (Prince 1964)	9.43 µm (Bourne et al. 1994)	10–15 µm (Murphy und Pollock 1993)	30 µm (Murphy und Pollock 1993)

Bemerkenswert ist, dass das Signal nur in der Hälfte der Dicke der Schicht auftritt, welche an das Stroma angrenzt. Beim Menschen werden histologisch zwei Schichten unterschieden, welche eine unterschiedliche Kollagenzusammensetzung aufweisen (Murphy et al. 1984, Smolek und Klyce 1993). Die anteriore gestreifte Schicht wird während der Embryogenese angelegt, während die posteriore nicht-gestreifte Schicht postnatal durch die endotheliale Produktion von Basalmembranbestandteilen lebenslang an Dicke zunimmt (Murphy et al. 1984). Ein weiterer anatomischer Erklärungsansatz für die Signalverteilung in dieser Studie wäre demnach, dass die unterschiedliche Kollagenzusammensetzung der Schichten (Murphy et al. 1984) für die nur einseitige Signalanreicherung durch aus dem Stroma in die Descemet-Membran diffundiertes IgG verantwortlich ist. Ob eine Zweischichtung der Descemet-Membran bei Hund, Katze oder Pferd vorliegt, ist jedoch bis dato nicht bewiesen; tatsächlich konnte in einer zielgerichteten lichtmikroskopischen Studie bei Katzenhornhäuten lediglich eine uniforme Erscheinung der Descemet-Membran festgestellt werden (Bourne et al. 1994).

4. 2. Pathologisch veränderte Hornhäute

Für die Studie stand eine zufällige Auswahl verschiedener Hornhautpathologien zur Verfügung, die aufgrund der geringen Anzahl keine statistische Auswertung der Ergebnisse erlaubte. Die Abweichung des IgG-Gehaltes in pathologisch veränderten Hornhäuten konnte bestätigt werden. Da die Hornhautschichten Epithel, Descemet-Membran und Endothel auch bei gesunden

Hornhäuten einen variablen IgG-Gehalt aufwiesen, beschränkt sich die Vergleichbarkeit auf das Stroma, welches bei allen gesunden Hornhäuten aller drei Tierarten physiologischerweise die Signalintensität 2 aufwies.

Die Unterteilung der Hornhautpathologien in vier Kategorien erlaubt eine differenziertere Betrachtung. In Kategorien 1 (mittel- bis hochgradig entzündliche, ulzerative Hornhautpathologien, Tab. 2) und 2 (geringgradig entzündliche, ulzerative Hornhautpathologien, Tab. 3) lag eine Abweichung der stromalen Signalintensität nach oben (2–3 oder 3) vor; bei einigen Tieren nur im Bereich der Läsion. Eine Ausnahme bildet der Hund H1 aus Kategorie 1 (Hornhautperforation; Signalintensität im Stroma 2), bei diesem Auge befand sich die Hornhautperforation jedoch außerhalb der Schnittebene. Auch bei manchen anderen Tieren stellte sich die Signalintensität des Stromas peripher der Läsion normal dar. Wie anhand der Beispiele in Abb. 1–3 ersichtlich ist, ging diese Abweichung der Signalintensität teilweise mit einem Verlust des linearen Färbemusters der physiologischen Kollagenfasern einher, war mit zellulärem Infiltrat, Kollagenolyse und/oder entzündlichem Exsudat bzw. je nach Chronizität kornealer Neovaskularisation vergesellschaftet. In Kategorie 3 (geringgradige, nicht-ulzerative korneale Veränderungen begleitend zu anderen okulären Pathologien, Tab. 4) wies das Stroma bis auf eine Ausnahme (Hund H6) eine physiologische Signalintensität auf. Beim Hund H6 (Keratitis pigmentosa, alte Hornhautperforation und anteriore Synechie, mature Katarakt) betrug, einhergehend mit kornealer Neovaskularisation, die Intensität 2–3. Kategorie 4 beinhaltete ausschließlich lamelläre Keratektomieproben. Bei einem Fall (Pferd P5, traumatische Hornhautlazeration) war das Stroma nicht beurteilbar. Bei den anderen Fällen (Hund H5 kristalline Keratopathie, Katzen K7–10 Schwarze Hornhautnekrosen) wies das Stroma entweder eine geringere (1–2) oder höhere Signalintensität (2–3) als physiologisch auf. Kategorie 4 unterscheidet von den anderen Kategorien, dass bei den lamellären Keratektomieproben stromale Schnittkanten vorhanden sind; dadurch könnte es einerseits bereits vor Fixation in Formaldehyd zu einem Verlust an IgG gekommen sein, andererseits sind Randartefakte an diesen stromalen Schnittkanten möglich (True 2008), die das Ergebnis der ohnehin kleinen Hornhautproben verfälschen könnten. Die erhöhte Signalintensität in Kategorie 1 und 2 könnte damit erklärt werden, dass in Fällen mit kornealer Neovaskularisation und/oder freien Entzündungsprodukten (Blut, Fibrin) die IgG-Menge im Stroma erhöht ist. Diese wäre auch eine mögliche Erklärung für die Fälle mit erhöhter Signalintensität in Kategorie 4, da kristalline Keratopathien und Schwarze Hornhautnekrosen mit kornealer Neovaskularisation einhergehen können (Glaze et al. 2021, Whitley und Hamor 2021).

Ein erhöhter IgG-Gehalt ist bei entzündlichen Hornhautveränderungen auch ohne bereits bestehende korneale Gefäßeinsprossung denkbar, da im Rahmen der Entzündung die erhöhte Permeabilität der limbalen Blutgefäße die zentripetale Diffusion von IgG in der Hornhaut verstärken kann (Ormerod 1986, Van der Veen et al. 1997). Entzündliches zelluläres Infiltrat im Stroma kann ebenfalls zu einer erhöhten Signalintensität führen, einerseits in Form von IgG-enthaltenden B-Lymphozyten, andererseits durch Freisetzung dieser Antikörper ins umgebende Stroma. Schwab (1959) konnte nachweisen, dass die Kaninchenhornhaut zwei Wochen nach einer intrakornealen Immunisierung lokal einen vierfach höheren IgG-Titer gegen das Antigen aufweist als nach intravenöser Immunisierung, was für eine lokale Antikörperproduktion und -freisetzung spricht (Schwab 1959).

Sowohl in der human- als auch veterinärophthalmologischen Literatur wurde der IgG-Gehalt bei diversen Hornhauterkrankungen untersucht. Da es sich dabei um andere Hornhautpathologien als in dieser Studie handelt, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Waldrep und Kollegen (1988) untersuchten den IgG-Gehalt bei einer Reihe von menschlichen Hornhauterkrankungen anhand isoelektrischer Fokussierung. Bei an Fuchs-Endotheldystrophie oder Keratokonus erkrankten Hornhäuten wich der IgG-Gehalt des Hornhautstromas nicht signifikant von dem gesunder Vergleichshornhäute ab. In Hornhautproben von Patienten mit Hornhautödem oder einer Abstoßungsreaktion nach erfolgter Hornhauttransplantation war hingegen deutlich weniger IgG nachweisbar (Waldrep et al. 1988). Letztere Ergebnisse erklären die Autoren mit einem potenziellen Ausschwemmen von IgG durch eine veränderte stromale Flüssigkeitsdynamik im Rahmen eines Hornhautödems, wie es auch bei den abgestoßenen Hornhäuten vorhanden war (Waldrep et al. 1988). Weiters führen sie eine unterschiedliche Proteoglykan- und Glukosaminoglykanzusammensetzung des Stromas bei manchen Erkrankungen als möglichen Einflussfaktor auf (Waldrep et al. 1988).

Eichenbaum und Kollegen (1986) untersuchten 14 Hornhäute von an chronischer superfizieller Keratitis erkrankten sowie vier Hornhäute von augengesunden Hunden mittels chromogener Immunhistochemie. Ein IgG-Signal konnten sie lediglich in einem Drittel der erkrankten Hornhäute im oberflächlichen Stroma nachweisen, während die gesunden Hornhäute kein Signal aufwiesen (Eichenbaum et al. 1986). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur vorliegenden Studie und zu der in Abschnitt 3. 1. aufgeführten Literatur über andere Spezies. Es ist möglich, dass die Fixation der Hornhäute in 4% Formaldehyd + 1% Glutaraldehyd zu einer Überfixation und dadurch geringeren Immunogenität des sowie schlechteren Antikörperpenetration in das

Hornhautgewebe führten (Hopwood 1969, Pow et al. 1995, Stradleigh und Ishida 2015). Weitere Unterschiede zu der vorliegenden Studie, wie die größere Schichtdicke von 5 Mikrometern als auch höhere Antikörperkonzentration von 1:1000 (Eichenbaum et al. 1988), sind ebenfalls denkbare Ursachen für die abweichenden Ergebnisse.

Pate und Kollegen (2012) verwendeten direkte Immunfluoreszenz zur Untersuchung lamelläre Keratektomieproben von einem gesunden als auch von zehn an oberflächlich-stromaler immun-mediierter Keratitis erkrankten Pferden. Die gesunde Pferdehornhaut wies kein Signal für IgG auf (Pate et al. 2012), was unter anderem der größeren Schichtdicke von 6 Mikrometern bzw. einer unzureichenden Sensitivität der Methode geschuldet sein könnte (True 2008). Alle erkrankten Hornhäute wiesen sowohl im Epithel als auch im Stroma ein IgG-Signal auf. Es wurden zwei verschiedene Signalmuster im Stroma der erkrankten Hornhäute beschrieben: ein starkes extrazelluläres Signal in Bereichen mit entzündlicher Infiltration und ein fibrilläres extrazelluläres Signal in Bereichen ohne Infiltration (Pate et al. 2012). Ersteres liegt in der vorliegenden Studie bei erkrankten Hornhäuten aus Kategorie 1 und 2 vor, während letzteres dem physiologischen IgG-Signalmuster gesunder Hornhäute entspricht (Allansmith et al. 1969, Yoshida et al. 1978, Allansmith et al. 1979). Beiden Studien (Eichenbaum et al. 1986, Pate et al. 2012) ist gemein, dass keine starke Korrelation zwischen dem IgG-Signal und der klinischen bzw. lichtmikroskopisch beurteilten Schwere der kornealen Erkrankung festgestellt werden konnte. Ebenso wurden die beiden Studien mit der Hypothese durchgeführt, dass der korneale IgG-Gehalt erkrankter Hornhäute einen Rückschluss auf die immun-medierte Pathogenese der chronischen superfiziellen Keratitis beim Hund und der immun-medierten Keratitis beim Pferd liefern könnte (Eichenbaum et al. 1986, Pate et al. 2012). Da in den gesunden Kontrollhornhäuten mit der jeweiligen Methode jedoch kein IgG nachweisbar war, obwohl gemäß der Literatur zu anderen Spezies und der vorliegenden Studie IgG ein konstitutiver Bestandteil der Hornhaut von Hund und Pferd ist, sind die Ergebnisse von Eichenbaum und Kollegen (1986) als auch von Pate und Kollegen (2012) nur unter Vorbehalt aussagekräftig.

4. 3. Methodik

Abgesehen von der untersuchten Spezies, bedarf die Vergleichbarkeit verschiedener Studien zum kornealen Antikörpergehalt untereinander als auch mit der vorliegenden Dissertationsstudie der Berücksichtigung diverser Faktoren. Einerseits unterscheiden sich die Fragestellungen. In einigen Studien lag der Fokus auf der Quantifizierung von Antikörpern in ganzen Hornhäuten oder

Teilbereichen (Krause 1932, Kawerau und Ott 1961, Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975), während andere differenziert die Verteilung von Immunglobulinen in den Hornhautschichten untersuchten (Allansmith et al. 1969, Allansmith et al. 1979, Eichenbaum et al. 1986, Waldrep et al. 1988, Pate et al. 2012). Andererseits bestimmt die Fragestellung die Methodik. Für eine objektive Quantifizierung der wasserlöslichen Globuline ist die Analyse eines Flüssigkeitsextraktes der Hornhaut notwendig. Anschließend können sie mittels Elektrophorese in verschiedene Klassen und Subtypen unterschieden werden (Kawerau und Ott 1961). Die Verteilung kann im Groben ebenfalls durch Flüssigkeitsextrakte unterschiedlicher Hornhautabschnitte untersucht werden (Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975), dafür eignet sich jedoch die Darstellung *in situ* mittels Immunhistochemie besser. Der Großteil der Studien verwendete dazu direkte (Allansmith et al. 1969, Pate et al. 2012) oder indirekte Immunfluoreszenz (Allansmith et al. 1979), die eine Lyophilisierung des zu untersuchenden Hornhautmaterials erfordert. Die Immunfluoreszenz erlaubt eine Quantifizierung des Signals; dies kann einerseits durch Messung der Fluoreszenz eines Mikroskopierfensters oder durch manuelle bzw. automatisierte Zählung fluoreszierender Zellen erfolgen (Tenbaum et al. 2012). Dadurch ist eine gewisse objektive Vergleichbarkeit möglich.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde für diese Studie die Methodik der chromogenen Immunhistochemie unter anderem aus Praktikabilitätsgründen gewählt, da sie auch die Untersuchung von unter klinischen Bedingungen gewonnenen Hornhautproben ermöglicht. Diese werden für eine histopathologische Beurteilung in der Regel dem Standardverfahren der Fixierung in Formalin mit anschließender Paraffineinbettung unterzogen, wodurch sie für eine chromogene Immunhistochemie geeignet sind (Stradleigh und Ishida 2015). Weil eine Überfixation Auswirkungen auf das immunhistochemische Signal hätte, da es durch übermäßige Quervernetzung von Proteinen zu einer veränderten Antigen-Antikörper-Bindung kommen kann (Hopwood 1969, True 2008), wurde für diese Studie der Fixationszeitraum auf ein Minimum von 12 und Maximum von 24 Stunden standardisiert.

Die semiquantitative Auswertung des Signals der chromogenen Immunhistochemie erfüllt den Anspruch eines Nachweises des Vorhandenseins und Verteilungsmusters von IgG (Walker 2006). Das Signal von IgG als wasserlösliches Molekül ist erwartungsgemäß diffus im Extrazellulärraum verteilt, weshalb eine Quantifizierung in Form von Zellzählung der Fragestellung nicht dienlich gewesen wäre. Aufgrund der multiplen probenassoziierten und technischen Einflussfaktoren auf die Signalausprägung (True 2008), ist die Auswertung einer jeden Probe auf den unmittelbaren

Vergleich mit den Positiv- und Negativkontrollen des jeweiligen Laufes angewiesen (Bogen et al. 2009). Dementsprechend ist dieser Methode eine gewisse Subjektivität bei der Interpretation inhärent (Walker 2006). Um eine einheitliche Beurteilung sämtlicher Proben zu gewährleisten, erfolgte diese durch eine einzelne Person, die Autorin, nach einer entsprechenden Einschulung. Eine Evaluierung von Intra- oder Interobserver-Variabilität der Methode war nicht Ziel dieser Dissertation.

4. 4. Einschränkungen und Ausblick

Als Einschränkungen der Dissertationsstudie sind die geringe Anzahl untersuchter Proben und die dadurch limitierte statistische Aussagekraft anzuführen. Für die Fragestellung des Nachweises von IgG bei gesunden Hornhäuten wurden 10 Augenpaare pro Tierart angestrebt. Die erzielte Anzahl ergab sich aus der Verfügbarkeit von frisch euthanasierten Tieren im Zeitraum der Probensammlung. An der Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Universität Wien sind vor allem fatale Koliken ein häufiger Euthanasiegrund augengesunder Pferde jeden Alters, wobei die Tierkörper aus rechtlichen und Praktikabilitätsgründen entweder dem Institut für Anatomie, dem Institut für Pathologie oder der Tierkörperverwertung zugeführt werden. An der Kleintierklinik können Hunde- und Katzentierkörper hingegen von den Tierbesitzern abgeholt und beispielweise einer Kremierung unterzogen werden, weshalb die Verfügbarkeit frisch euthanasierter Tierkörper bei diesen Tierarten geringer ist. Zusätzlich zeigen vor allem ältere Kleintiere teilweise uni- oder bilaterale korneale Veränderungen, weshalb für Hund und Katze eine ungerade Anzahl an Augen für die Studie zur Verfügung standen.

Es kann als Limitierung betrachtet werden, dass keine Augenuntersuchung am lebenden oder euthanasierten Tier vor Gewinnung der Augäpfel durchgeführt wurde. Die Gesundheit der Hornhäute wurde jedoch mittels lichtmikroskopischer Beurteilung auf histopathologischer Ebene festgelegt.

Nachdem die Präsenz von IgG im Hornhautstroma von Hund, Katze und Pferd belegt ist, wäre als möglicher Gegenstand zukünftiger Studien die Charakterisierung hinsichtlich der vorhandenen IgG-Subtypen zu nennen. Ebenso stellt die absolute und im Vergleich zum Blutserum relative Quantifizierung der Antikörper einen Forschungsansatz dar, um die Informationslücken respektive der zu Menschen- und Kaninchenhornhäuten existierenden Literatur zu schließen (Stock und Aronson 1970, Allansmith und McClellan 1975, Allansmith et al. 1979, Verhagen 1990). Dies gilt auch für die weiteren Immunglobulinklassen. Betreffend der anderen

Hornhautschichten könnte ein Vergleich verschiedener Nachweismethoden Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maß IgG darin enthalten sind (Walker 2006). Ein weitläufiges Forschungsfeld stellen Hornhautpathologien dar und die Frage, welchen Einfluss Faktoren wie ein stromales Hornhautödem oder korneale Gefäßeinsprossung auf den IgG-Gehalt haben.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung. Ziel der Studie war es, das Vorkommen und Verteilungsmuster von IgG-Antikörpern in der equinen, kaninen und felinen Hornhaut mittels Immunhistochemie zu untersuchen.

Material und Methode. Gesunde Hornhäute von Pferden, Hunden und Katzen, welche aufgrund einer schwerwiegenden Erkrankung oder eines unbehandelbaren Traumas ohne okuläre Beteiligung oder bekannte okuläre Vorerkrankungen euthanasiert worden waren, wurden nach Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung lichtmikroskopisch als pathomorphologisch gesund bestätigt. Kranke Hornhäute derselben Tierarten wurden nach dem gleichen Protokoll untersucht. Die immunhistochemische Färbemethode wurde automatisiert durchgeführt und bediente sich Primärantikörper gegen das tierartspezifische IgG, Biotin-konjugierter Sekundärantikörper, Streptavidin-Peroxidase und Diaminobenzidin zur Sichtbarmachung der gesuchten Antikörper. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin wurde die Signalintensität von Epithel, Stroma, Descemet-Membran und Endothel lichtmikroskopisch nach einer semiquantitativen 4-Punkte-Skala (0 = keine, 1 = geringgradige, 2 = mittelgradige, 3 = hochgradige Signalausprägung) bewertet.

Ergebnisse. Eingeschlossen wurden gesunde Hornhäute von 20 Pferden (40 Augen) mit einem medianen Alter von 15,5 Jahren, 12 Hunden (21 Augen) mit einem medianen Alter von 10,0 Jahren und 13 Katzen (24 Augen) mit einem medianen Alter von 10,0 Jahren. Von jeder Tierart waren diverse Geschlechter, Kastrationsstatus und Rassen vertreten. Sämtliche gesunden Hornhäute aller Tierarten wiesen durchgehend eine mittelgradige Signalausprägung für IgG-Antikörper im Stroma auf. Die Signalausprägung in Epithel, Descemet-Membran und Endothel erwies sich als variabel. Es wurden pathologisch veränderte Hornhautproben von allen drei Tierarten untersucht und bei den meisten im Stroma eine abweichende Signalausprägung für IgG festgestellt.

Fazit. Die verwendete immunhistochemische Methodik eignet sich zur reproduzierbaren Visualisierung von IgG-Antikörpern in der Hornhaut von Pferden, Hunden und Katzen. Die semiquantitativen Ergebnisse lassen auf die konstitutive Präsenz von IgG-Antikörpern im Hornhautstroma der untersuchten Tierarten schließen. Der Antikörpergehalt von erkrankten Hornhäuten scheint von dem gesunder Hornhäute abzuweichen und sollte Gegenstand weiterführender Studien sein.

6 Summary

Objective. Establishing an immunohistochemical approach for semiquantitative assessment of the presence of IgG in equine, canine and feline corneas.

Procedures. Healthy corneas of horses, dogs and cats, euthanized because of a fatal disease or an unrecoverable trauma unrelated to and without a history of ophthalmic disease, were formalin-fixed, paraffin-embedded and determined to be pathomorphologically healthy by light microscopy. Diseased corneas of the same species were subjected to the same protocol. Automated immunohistochemistry was performed using primary antibodies against IgG, biotin-conjugated secondary antibodies, and streptavidin- peroxidase, as well as diaminobenzidine for visualization. After counterstaining with hematoxylin, epithelium, stroma, Descemet's membrane (DM), and endothelium were semi-quantitatively scored on a 4-grade scale (0 = no, 1 = faint, 2 = medium, 3 = strong signal intensity) by light microscopy.

Results. Corneal specimen of 20 horses (40 eyes) with a median age of 15.5 years, 12 dogs (21 eyes) with a median age of 10.0 years and 13 cats (24 eyes) with a median age of 10.0 years were included in the study. Different sexes and breeds were represented. In all corneas, significant medium signal intensity in the stroma was observed. Variable immunosignal was observed in epithelium, DM and endothelium. Most diseased corneas of all three species showed a differing signal expression within the stroma.

Conclusion. This method reproducibly allows for detection of IgG in healthy equine, canine and feline corneas. Semiquantitative results evidence constitutive presence of IgG in the corneal stroma. The stromal IgG content of diseased corneas seems to differ from that of healthy corneas and should be the subject of further research.

7 Abkürzungsverzeichnis

CSK	Chronische Superfizielle Keratitis
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMMK	Immun-medierte Keratitis
PIFM	Prä-iridale fibrovaskuläre Membran

8 Literaturverzeichnis

- Agrisera, <https://www.agrisera.com/en/info/molecular-weight-and-isoelectric-point-of-various-immunoglobulins.html> (Zugriff 17.03.2022).
- Aiello F, Congliaro P, Malaspina C, et al. 2021. Peripheral ulcerative keratitis as the primary clinical manifestation of type 2 cryoglobulinemia. *Can J Ophthalmol*, 56(5):148-150.
- Allansmith M, Newman L, Hutchinson DS. 1969. Immunoglobulin G in the rabbit cornea. *Arch Ophthalmol*, 82:229-231.
- Allansmith M und Whitney CR. 1973 Immunoglobulins in the human eye. *Arch Ophthalmol*, 69:36-45.
- Allansmith MR und McClellan BH. 1975 Immunoglobulins in the human cornea. *Am J Ophthalmol*, 80:123-132.
- Allansmith M, de Ramus A, Maurice D. 1978. The dynamics of IgG in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 18:947-955.
- Allansmith MR, Kashima K, Yamamoto GK. 1979. IgG in human cornea stained by various techniques. *Ann Ophthalmol*, 11(10):1469-73.
- Amemiya T, Yoshida H, Yoshida M, et al. 1977. Ocular pathology of rhino mouse. I. Ultrastructure of the cornea; a model of corneal dystrophy. *J Jpn Ophthalmol Soc*, 81:1814-1821.
- Andrew SE. 2008. Immune-Mediated Canine and Feline Keratitis. *Vet Clin Small Anim*, 38:269-290.
- Aronson SB, Goodner EK, Yamamoto E, et al. 1965. Mechanism of host response in the eye. I. Changes in anterior eye following immunization to heterologous antigen. *Arch Ophthalmol*, 73:402-412.
- Aronson SB, McMaster PRB, Moore TE, et al. 1970. The pathogenesis of suture toxicity. *Arch Ophthalmol*, 84:641-644.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Hrsg. 2007. Das Immunsystem. In: Biochemie. Sechste Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1058-1066.
- Bogen SA, Vani K, McGraw B, et al. 2009. Experimental validation of peptide immunohistochemistry controls. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 17(3):239-46.
- Brandtzaeg P und Rognum TO. 1984. Evaluation of nine different fixatives. *Pathol Res Pract*, 179:250-266.
- Braus BK, Miller I, Kummer S, et al. 2017. Investigation of corneal autoantibodies in horses with immune mediated keratitis (IMMK). *Vet Immunol Immunopathol*, 187:48-54.
- Brooks DE, Matthews A, Clode AB. 2017. Diseases of the cornea. In: Gilger BC, Hrsg. Equine Ophthalmology. Dritte Aufl. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 252-368.

- Bourne WM, Nelson LR, Buller CR, et al. 1994. Long-term observation of morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(3):891-9.
- Campbell LH, Okuda HK, Lipton DE, et al. 1975. Chronic superficial keratitis in dogs: detection of cellular hypersensitivity. *Am J Vet Res*, 36(5):669-71.
- Chan T, Payor S, Holden BA. 1983. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24:1408-1410.
- Chi H, Hao W, Qi X, et al. 2021. A proteomic approach towards understanding the pathogenesis of Mooren's ulcer. *Exp Eye Res*, 205:108509.
- Ciralsky J, Lai E, Waring GO, et al. 2016. A Matrix of Pathologic Responses in the Cornea. In: Mannis MJ, Holland EJ, Hrsg. *Cornea*. Vierte Aufl. New York: Elsevier, Inc., 46-71.
- Cleymaet AM, Hess AM, Freeman KS. 2016. Comparison between Pentacam-HR and optical coherence tomography central corneal thickness measurements in healthy feline eyes. *Vet Ophthalmol*, 19 Suppl 1:105-14.
- Cohen S und Milstein C. 1967. Structure and biologic properties of immunoglobulins. *Adv Immunol*, 7:1-89.
- Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, et al. 2002. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43:2127-2135.
- Duke-Elder S und Wybar KC. 1961. In: *System of Ophthalmology: Volume II, The Anatomy of the Visual System*. London: Henry Kimpton.
- Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, et al. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 63(1):78-85.
- Eichenbaum JD, Lavach JD, Gould DH, et al. 1986. Immunohistochemical staining patterns of canine eyes affected with chronic superficial keratitis. *Am J Vet Res*, 47(9):1952-5.
- English R und Gilger BC. 2021. Ocular Immunology. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 263-292.
- Espana EM und Birk DE. 2020. Composition, structure and function of the corneal stroma. *Exp Eye Res*, 198: 108137.
- Garibaldi DC, Gottsch J, de la Cruz Z, et al. 2005. Immunotactoid keratopathy: a clinicopathologic case report and a review of reports of corneal involvement in systemic paraproteinemias. *Surv Ophthalmol*, 50(1):61-80.
- Garzón-Ariza A, Guisado A, Galán A, et al. 2017. Diurnal variations in intraocular pressure and central corneal thickness and the correlation between these factors in dogs. *Vet Ophthalmol*, 20:1-7.

- Germuth FG, Maumenee AE, Pratt-Johnson J, et al. 1958. Observations on the site and mechanism of antigen-antibody interaction in anaphylactic hypersensitivity. *Am J Ophthalmol*, 46(5 Pt 2):282-286.
- Gilger BC, Whitley RD, McLaughlin SA, et al. 1991. Canine corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry. *Am J Vet Res*, 52, 1570-1572.
- Gilger BC, Wright JC, Whitley RD, et al. 1993. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *Am J Vet Res*, 54:228-230.
- Glaze MB, Maggs DJ, Plummer CE. 2021. Feline Ophthalmology. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1665-1840.
- Göbel T und Kaspers B. 2010. Blut: Immunabwehr. In: von Engelhardt W, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. Dritte Aufl. Stuttgart: Enke Verlag, 219-237.
- Grahn BH und Peiffer RL. 2021. Veterinary Ophthalmic Pathology. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 479-563.
- Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, et al. 2003. The Corneal Stroma Is Endowed with a Significant Number of Resident Dendritic Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44:581-589.
- Hannush SB und Riveroll-Hannush L. 2016. Preoperative Considerations and Decision-Making in Keratoplasty. In: Mannis MJ, Holland EJ, Hrsg. *Cornea*. Vierte Aufl. New York: Elsevier, Inc., 1256-1263.
- Herbig LE und Eule CJ. 2015. Central corneal thickness measurements and ultrasonographic study of the growing equine eye. *Vet Ophthalmol*, 18:462-471.
- Holt WS und Kinoshita JH. 1973. The soluble proteins of the bovine cornea. *Invest Ophthalmol*, 12(2):114-26.
- Hopwood D. 1969. Fixatives and fixation: a review. *Histochem J*, 1(4):323-60.
- Jakus MA. 1956. Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. *J Biophys Biochem Cytol*, 2(4 Suppl):243-252.
- Kawaji H, Tsukuda R, Nakaguchi T. 1980. Immunopathology of Rhino Mouse, an autosomal recessive mutant with murine Lupus-like disease. *Acta Pathol Jpn*, 30(4):515-530.
- Kawerau E, Ott H. 1961. The soluble proteins of the cornea. Paper and immunoelectrophoretic studies. *Exp Eye Res*, 1:137-44.
- Kleta R, Blair SC, Bernardini I, et al. 2004. Keratopathy of multiple myeloma masquerading as corneal crystals of ocular cystinosis. *Mayo Clin Proc*, 79(3):410-2.
- Knop E und Knop N. 2007. Anatomy and immunology of the ocular surface. *Chem Immunol Allergy*, 92:36-49.
- Krause AC. 1932. The chemical constitution of the cornea. *Am J Ophthalmol*, 15:422-424.

- Kremer I, Wright P, Merin S, et al. 1989. Corneal subepithelial monoclonal kappa IgG deposits in essential cryoglobulinemia. *British J of Ophthal*, 73:669-673.
- Lamm ME und Small PA. 1966. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. II. γ M-immunoglobulin. *Biochemistry*, 5(1):267.
- Leibowitz HM und Elliott JH. 1965. Antibody production in corneal hypersensitivity. *Arch Ophthalmol*, 73:687-695.
- Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, et al. 1997. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing. *Curr Eye Res*, 16(3):214-221.
- Liu J und Li Z. 2021. Resident Innate Immune Cells in the Cornea. *Front Immunol*, 12:620284.
- Maggs DJ. 2018. Diseases of the Cornea and Sclera. In: Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, Hrsg. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. St. Louis, MO: Elsevier, 213-253.
- Martín-Suárez E, Molleda C, Tardón R, et al. 2014. Diurnal variations of central corneal thickness and intraocular pressure in dogs from 8:00 am to 8:00 pm. *Can Vet J*, 55(4):361-365.
- Matoba AY, Chevez-Barrios P, Jones DB. 2010. Atypical corneal immunoglobulin deposition in a patient with dysproteinemia. *Cornea*, 29(1):105-7.
- Maurice M. 1957. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*, 136:263-286.
- Maurice DM und Watson PG. 1965. The distribution and movement of serum albumin in the cornea. *Exp Eye Res*, 4(4):355-63.
- Maurice DJ und Riley MV. 1970. The Cornea. In: Graymore CN, Hrsg. *Biochemistry of the eye*. Erste Aufl. London, New York: Academic Press London, 1– 103.
- McClellan BH, Whitney CR, Newman LP, et al. 1973. Immunoglobulins in tears. *Am J Ophthalmol*, 76(1):89-101.
- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*. 1948, 29(1):58-69.
- Meekins JM, Rankin AJ, Samuelson DA. 2021. Ophthalmic Anatomy. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 41-123.
- Mishima S. 1968. Corneal thickness. *Surv Ophthalmol*, 13:57–96.
- Mondino B, Brown SI, Rabin BS. 1979. Corneal inflammation and complement. *Doc Ophthalmol Proc Ser*, 20:11-17.
- Morawiecki J. 1956. Precipitation in the living cornea during antigen-antibody reactions. *Doc Ophthalmol*, 132:236-243.
- Murphy CJ und Pollock RV. 1993. The eye. In: Evans HE, Hrsg. *Miller's Anatomy of the Dog*. Dritte Aufl. Philadelphia: WB Saunders, 1009–1055.

- Murphy C, Alvarado J, Juster R, et al. 1984. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25(3):312-22.
- Nassisse MP. 1990. Feline Herpesvirus Ocular Disease. *Vet Clin Small Anim*, 20:667-680.
- Nishida T, Saika S, Morishige N. 2016. Cornea and Sclera: Anatomy and Physiology. In: Mannis MJ und Holland EJ, Hrsg. *Cornea*. Vierte Aufl. New York: Elsevier, 1-22.
- Ormerod LD. 1986. Immunological concepts and the eye: a review of the classical and ocular arthus reactions. *Doc Ophthalmol*, 64(4):387-417.
- Osusky R, Morell A, Imbach PA, et al. 2004. Diffusion of immunoglobulins into rabbit cornea after subconjunctival injection: Experimental demonstration and mathematical model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 231:122-128.
- Pain RH. The Molecular Weights of the Peptide Chains of the Peptide Chains of γ -Globulin. *Biochem J*, 88(2): 234–239.
- Parks JJ, Leibowitz HMI, Maumenee AE. 1962. Immediate hypersensitivity reactions in the cornea of the guinea pig. *J Immunol*, 89:323-325.
- Pate DO, Clode AB, Olivry T, et al. 2012. Immunohistochemical and immunopathologic characterization of superficial stromal immune-mediated keratitis in horses. *Am J Vet Res*, 73(7):1067-73.
- Pepose JS. 1991. Herpes simplex keratitis. Role of viral infection vs. immune response. *Surv Ophthalmol*, 35:345.
- Pinto NI und Gilger BC. 2014. Spectral-domain optical coherence tomography evaluation of the cornea, retina, and optic nerve in normal horses. *Vet Ophthalmol*, 17 Suppl 1:140-8.
- Pirie CG, Alario AF, Barysaukas CM, et al. 2014. *Equine Vet J*, 46(5):631-634.
- Plummer CE. 2021. *Equine Ophthalmology*. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1841-1982.
- Pow DV, Wright LL, Vaney DI. 1995. The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *J Neurosci Methods*, 56(2):115-23.
- Prince JC. 1964. *The Rabbit in Eye Research*. Springfield: C.C. Thomas, 84–124.
- Reynaud C, Rousseau A, Kaswin G, et al. 2017. Persistent Impairment of Quality of Life in patients with Herpes Simplex Keratitis. *Ophthalmol*, 124(2):160-169.
- Schwab F. 1959. Untersuchungen über den Antikörpergehalt der Hornhaut nach lokaler Antibiotica-Medikation. *Albrecht v Graefes Arch Ophthal*, 161:298–308.
- Singh P, Gupta A, Tripathy K. Keratitis. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559014/> (Zugriff 17.03.2022).
- Smolek MK und Klyce SD. 1993. Cornea. In: Wasman W und Jaeger EA, Hrsg. *Biomedical Foundations of Ophthalmology*. Vol. 1. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott, 1-20.

- Smolin G und Hall JM. 1973. Afferent arc of the corneal immunologic reaction. II. Local and systemic response to bovine gamma-globulin. *Arch Ophthalmol*, 90:231-234.
- Steuhl KP. 2000. Entzündliche Hornhauterkrankungen. In: Kampik A und Grehn F, Hrsg. *Augenärztliche Differenzialdiagnose*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 169-180.
- Stock EL und Aronson SB. 1970. Corneal immune globulin distribution. *Arch Ophthalmol*, 84(3):355-9.
- Stradleigh TW und Ishida AT. 2015. Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res*, 48:181-202.
- Streilein JW, Dana MR, Ksander BR. 1997. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today*, 18(9):443-449.
- Taylor AW. 2016. Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Front Immunol*, 7:37.
- Tenbaum, SP, Palmer, HG, Arques O, et al. 2012. Standardized Relative Quantification of Immunofluorescence Tissue Staining. Protocol exchange. DOI 10.1038/protex.2012.008 (Zugriff 17.03.2022).
- Tomasi TB Jr und Zigelbaum S. 1963. Selective occurrence of γ -1A globulins in certain body fluids. *J Clin Invest*, 42(10):1552-1560.
- True LD. 2008. Quality control in molecular immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 130(3):473-80.
- Van der Veen G, Broersma L, Bruyne I, et al. 1997. Influx of immunoglobulins from the vascular compartment into a grafted cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(5):876-83.
- Verhagen C, Breeboort AC, Kijlstra A. 1990. Diffusion of immunoglobulin G from the vascular compartment into the normal rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 31(8):1519-25.
- Viswanathan V, Agashe P, Jain V, et al. 2016. Crystalline keratopathy due to intravenous immunoglobulin in a 12-year-old girl with Kawasaki disease. *J AAPOS*, 20:466-468.e1.
- Waldrep JC, Noe RL, Stulting RD. 1988. Analysis of human corneal IgG by isoelectric focusing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29(10):1538-43.
- Walker RA. 2006. Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*, 49(4):406-10.
- Wessely K. 1911. Über anaphylaktische Erscheinungen an der Hornhaut (Experimentelle Erzeugung einer parenchymatösen Keratitis durch artfremdes Serum.). *Münch Med Wochenschr*, 58:1713-1714.
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. 2001. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*, 79(3):214-21.

Whitley RD und Hamor RE. 2021. Diseases and Surgery of the Canine Cornea and Sclera. In: Gelatt KN, Hrsg. *Veterinary Ophthalmology*. Sechste Aufl. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1082-1172.

Williams DL. 2005. Major histocompatibility class II expression in the normal canine cornea and in canine chronic superficial keratitis. *Vet Ophthalmol*, 8(6):395-400.

Witmer RH. 1955. Antibody formation in rabbit eye studied with fluorescein-labeled antibody. *AMA Arch Ophthalmol*, 53(6):811-6.

Wolfel AE, Pederson SL, Cleymaet AM, et al. 2018. Canine central corneal thickness measurements via Pentacam-HR[®], optical coherence tomography (Optovue iVue[®]), and high-resolution ultrasound biomicroscopy. *Vet Ophthalmol*, 21(4):362-370.

Yoshida M, Amemiya T, Yoshida H, et al. 1978. Ocular pathology of rhino mouse. III. Immunohistology of the cornea - A model of corneal dystrophy. *J Jpn Ophthalmol Soc*, 82:941- 947.

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Barbara Nell für die Ermöglichung dieser Dissertation, Ihre fundamentale Unterstützung bei der Ausführung und die einzigartige Ausbildung, welche ich in den sehr lehrreichen fünf Jahren an der Augenstation unter Ihrer Supervision erfahren durfte.

Weiters möchte ich meiner Zweitbetreuerin Prof. Dr. Angelika Url danken: ohne Ihre Expertise, grundlegende Unterstützung und den stets konstruktiv und zeitnah gelieferten wissenschaftlichen Input wäre dieses Forschungsprojekt nicht möglich gewesen. Dem Team des Institutes für Pathologie, insbesondere Petra Kodajova, danke ich ebenfalls für ihre maßgebliche und wertvolle Unterstützung bei der methodischen Ausführung.

Ich danke den MitarbeiterInnen der Kleintierchirurgie und der Pferdeklinik, die mich tatkräftig, großzügig und zu jeder Tages- und Nachtzeit bei der Probenakquise für die Forschungsarbeit unterstützt haben.

Meinen lieben aktuellen sowie ehemaligen KollegInnen der Augenstation Lisa-Marie Müllerleile, Vera Prucha, Klaas-Ole Blohm, Ulrike Lessiak, Miriam Szameitat, Victoria Zwiauer-Wolfbeisser, Julia Högler, Lukas Wess und Sophie Hofmann-Wellenhof, gebührt mein besonders herzlicher Dank. Die Zusammenarbeit mit euch bereitete mir viel Freude und eure wertvolle Unterstützung in jeglicher Form hat maßgeblich zur Entstehung dieser Forschungsarbeit beigetragen. Die entstandenen Freundschaften sind das schönste Begleitergebnis dieser Dissertation.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für eure Unterstützung, euer Verständnis und das geduldige Zuhören danken.

Danke, Zurbarán, für die vielen erholsamen Stunden rund um den Waschberg an der frischen Luft – ob bei Sonnenschein oder im Schneesturm –, die Balsam für meine Seele waren.

Und nicht zuletzt möchte ich Peter danken – du bist Balsam für mein Herz.