

B Literaturübersicht

1 Biotin

1.1 Geschichtliches

Einen Beitrag zur Entdeckung des Biotins leistete die bereits um die vorletzte Jahrhundertwende gemachte Beobachtung über die toxische Wirkung roher Eier im Tierversuch und über die Heilung der durch diese Diät verursachten Hautläsionen durch Behandlung mit einem hitzestabilen Faktor aus Hefe oder Leber (FRIEDRICH, 1987).

WILDIERS (1901) entdeckte den Wachstumsfaktor „Bios“ bei Hefen. GYÖRGY (1931) zeigte, dass der „Faktor X“ unterschiedliche Funktionen erfüllt und eine gleichbleibende chemische Verbindung darstellt. Er nannte diese Verbindung „Vitamin H“ (H für Haut). KÖGEL und TÖNNIS (1936) isolierten eine Substanz aus Eidotter und gaben der Substanz den Namen „Biotin“. Biotin war identisch mit dem „Schutzfaktor X“ und „Vitamin H“. DU VIGNEAUD et al. (1942) entdeckten die chemische Struktur des Biotins.

HARRIS et al. (1943) gelang die erste Synthese. GOLDBERG und STERNBACH (1949) entwickelten ein Verfahren zur industriellen stereoselektiven Synthese von Biotin, das im Prinzip heute noch angewendet wird (BITSCH und BARTEL, 1994).

1.2 Vorkommen und Bioverfügbarkeit

Biotin ist in der Natur weit verbreitet. Besonders biotinreich sind Hefe, Eigelb, Leber und Niere (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998), sowie Raps, Gerste, Sonnenblume und Sojabohne (FRIEDRICH, 1987). In tierischen Geweben und Hefe liegt Biotin überwiegend an Protein gebunden, in Pflanzen teilweise in freier, wasserlöslicher Form vor (BÄSSLER et al., 1992; BONJOUR, 1991; BUDDECKE, 1980). Biocytin (ϵ -N-Biotinyl-L-Lysin) ist das kovalent an ein Protein gebundene Biotin (AMMERMANN et al., 1995). Es wird im proximalen Dünndarm durch proteolytische Enzyme und Pankreas-Biotinidasen gespalten in freies, resorbierbares Biotin. Das freie Biotin wird durch Diffusion und aktiven

Transport aufgenommen (BITSCH u. BARTEL, 1994; BÄSSLER et al, 1992; BONJOUR, 1991). Für die Aufnahme von Biotin in die Zellen werden zwei verschiedene Transportsysteme beschrieben. Ein klassischer Cotransport und ein Multivitamintransporter für Biotin, Pantothensäure und Liponsäure. Beide Transportsysteme sind natriumabhängig (ZEMPLINI u. MOCK, 2001; SAID, 1999; PRASAD et al., 1998).

Die Ausscheidung von Biotin über den Urin und die Fäzes ist in der Regel höher, als die Menge, die von außen zugeführt wird (BONJOUR, 1991), d.h. Biotin wird zwar im Verdauungstrakt synthetisiert, aber im Dickdarm findet nur eine geringe (WHITEHEAD, 1988) bis keine Resorption mehr statt. Dieses Biotin steht dem Organismus somit nicht zur Verfügung (BITSCH und BARTEL, 1994).

Über die Bioverfügbarkeit von Biotin in Futtermitteln liegen vor allem für Hühner (FRIGG u. BRUBACHER, 1976; FRIGG, 1976) Schätzungen vor. Die Bioverfügbarkeit von Biotin ist in einigen Futtermitteln nur sehr gering. Mit einem Bioassay für Kükenwachstum (chick growth assay) zeigte FRIGG (1984), dass die Bioverfügbarkeit des vorhandenen Biotins zwischen 0-4 % bei Weizen und 100 % bei Mais betragen kann. Bei Schweinen, die mit Weizen und Gerste gefüttert wurden, sind deutliche Mangelercheinungen beobachtet worden. Das lässt vermuten, dass die Bioverfügbarkeit von Biotin bei einigen Futtermitteln auch für das Schwein gering sein dürfte (WHITEHEAD, 1988).

Die Ursachen für die geringe Bioverfügbarkeit in einigen Futtermitteln sind noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass das Biotin in physikalischen oder chemischen Bindungen vorliegt und dadurch nicht mehr verdaulich ist (WHITEHEAD, 1988).

An Kühe oral verabreichtes Biotin wird ohne bedeutenden Abbau im Pansen aufgenommen (FRIGG et al., 1993; ZINN et al., 1987). FRIGG et al. (1993) zeigten außerdem, dass sich der Blutserumspiegel bei einer Dosis von 20 mg/Tag deutlich erhöht.

1.3 Chemie

Es werden mehrere Synonyme in der Literatur erwähnt, z.B. Vitamin H (H = Haut), Schutzfaktor X, Coenzym R (MOSS u. LANE, 1971), Vitamin B_w, Vitamin B₇ (BÄSSLER et al., 1992) und antiseborrhoisches Vitamin (BITSCH u. BARTEL 1994).

Biotin ist eine Verbindung aus Harnstoff und einem substituierten Thiophanring (LÖFFLER u. PETRIDES 1998). Es ist ein wasserlösliches Vitamin und wird zum B-Komplex gezählt (COOPER, 1993). Nach COOPER (1993) ist Biotin eine cis-Hexahydro-2oxo-1H-Thieno[3,4]-Imidazol-4-Valeriansäure mit der Summenformel C₁₀H₁₆N₂O₃S. In dieser Verbindung mit drei asymmetrischen Kohlenstoffatomen können vier Diastereoisomere mit je zwei Enantiomeren und somit acht optisch aktive Formen vorkommen. Nur das biologisch aktive D-(+)-Biotin kommt in der Natur vor (BÄSSLER et al., 1992; FRIEDRICH, 1987) und zeigt die deutlichste biologische Aktivität (COOPER, 1993).

Biotin ist in kristallisierter Form gegen Luft, Tageslicht und Hitze stabil, aber instabil bei UV-Licht (BÄSSLER et al., 1992). Beim Erhitzen in stark sauren und alkalischen Lösungen geht die Bioaktivität von Biotin verloren (FRIEDRICH, 1987). Biotin ist leicht löslich in heißem Wasser, verdünntem Alkohol und 95 % Ethanol (WHITEHEAD, 1988).

1.4 Biochemie

1.4.1 Biotin als Coenzym

Biotin fungiert als kovalent gebundene prosthetische Gruppe bei einer Reihe von Carboxylase-, Transcarboxylase- und Decarboxylasereaktionen. Biotin hat so Einfluß auf diverse Stoffwechselwege (MOCK, 1992; MOSS u. LANE, 1971).

Beim Tier und beim Menschen sind 4 Carboxylase-Reaktionen von Bedeutung (WEISS u. ZYMMERLY, 2000; LÖFFLER u. PETRIDES, 1998; MOCK, 1996; BÄSSLER et al., 1992). Auf diese Enzyme (Acetyl-CoA-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase, Propionyl-Carboxylase und β -Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase) soll hier kurz eingegangen werden.

Bei diesen Reaktionen ist Biotin kovalent an eine freie ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes der jeweiligen Carboxylase gebunden. Biotin übernimmt CO_2 aus Bicarbonat und bildet 1-N-Carboxybiotin (1. Schritt), um dann das CO_2 auf die jeweilige Akzeptor-Substanz zu übertragen (2. Schritt) (COOPER, 1993; BÄSSLER et al., 1992; BUDDECKE, 1980). Diese Einteilung in zwei Schritte vertreten MOSS und LANE (1971) auch für die anderen biotinabhängigen Enzyme.

Die **Acetyl-CoA-Carboxylase** carboxyliert im Cytosol Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Dies ist der entscheidende Schritt in der Fettsäuresynthese (STRYER, 1999; LÖFFLER u. PETRIDES 1998; BÄSSLER, 1992). Diese Reaktion benötigt ausserdem ATP und Mg^{2+} (COOPER, 1993).

Die **Pyruvat-Carboxylase** katalysiert innerhalb der Mitochondrien die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat, ein Zwischenprodukt in der Biosynthese von Phosphoenolpyruvat und schließlich von Glucose. Dieses Enzym ist ein Schlüsselenzym in der Gluconeogenese (STRYER, 1999; BÄSSLER, 1992). Eine weitere wichtige Funktion der Pyruvat-Carboxylase ergibt sich aus dem Bedarf an Oxalacetat im Mitochondrium, um das dort gebildete Acetyl-CoA ins Cytosol auszuschleusen. Acetyl-CoA wird für die Fettsäuresynthese im Cytosol benötigt, es kann jedoch nicht die Mitochondrienmembran ohne Oxalacetat überwinden. Somit spielt die Pyruvat-Carboxylase auch eine Rolle bei der Fettsäuresynthese (COOPER, 1993).

Die **Propionyl-Carboxylase** carboxyliert Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA im Mitochondrium. Methylmalonyl-CoA wird als Succinyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust (STRYER, 1999; LÖFFLER u. PETRIDES, 1998). Propionate, die beim Abbau ungradzahliger Fettsäuren, Aminosäuren (Methionin, Threonin und Isoleucin) und bei der Pansenfermentation entstehen, bekommen so Anschluss an den Citratzyklus. Dies ist besonders wichtig bei Wiederkäuern, da Propionsäure als Produkt des Kohlenhydratabbaus im Pansen den wichtigsten Energielieferanten darstellt (COOPER, 1993).

Die **Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase** katalysiert, ebenfalls im Mitochondrium, die Carboxylierung von Methylcrotonyl-CoA zu β -Methylglutaconyl-CoA, ein

Literaturübersicht

Schritt beim Abbau der verzweigten Aminosäure Leucin (BÄSSLER, 1992). Als Endprodukt entsteht unter anderem Acetyl-CoA, das wiederum in die Fettsäuresynthese, die Glutaminsynthese oder in weitere Stoffwechselwege eingeht (COOPER, 1993).

1.4.2 Weitere Funktionen

Mit in vivo und in vitro Versuchen wurde gezeigt, dass durch Biotinzugaben die Aminosäureverbindungen in Proteinen der Leber, Darmschleimhaut und Haut zunehmen (BOECKX u. DAKSHINAMURTI, 1974). Durch Biotinzugabe in das Medium von HeLa-Zellkulturen konnte weiterhin eine Erhöhung des Zellwachstums, der Proteinsynthese und der DNA-Synthese nachgewiesen werden (SINGH u. DAKSHINAMURTI, 1988). Es wird vermutet, dass Biotin eine wichtige Rolle bei der Transkription, Replikation und Reparatur der DNA spielt und somit Einfluss auf die Genexpression hat (CRISP et al., 2004; STANLEY et al., 2001; HYMES et al., 1995).

Eine hormonähnliche Wirkung von Biotin auf die Proteinsynthese wird diskutiert, da festgestellt wurde, dass Biotin in pharmakologischen Dosen auch eine Erhöhung des cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) bewirkt (SINGH u. DAKSHINAMURTI, 1988; SPENCE u. KOUDELKA, 1984; VESELY et al., 1984; VESELY, 1982). SPENCE und KOUDELKA (1984) zeigten an Rattenleber-Zellkulturen, dass unter Biotineinfluss erst cGMP intrazellulär ansteigt, sich dann die translatierbare Glukokinase-RNA und somit die Glukokinaseaktivität erhöht. Dies erinnert an eine second-messenger vermittelte Übertragung, wie sie bei Hormonen bekannt ist. Weiterhin wurde an biotindefizienten HeLa-Zellen und Fibroblastenkulturen gezeigt, dass dosisabhängige Biotingaben unterschiedliche Wirkungen zeigen. Physiologische Biotinkonzentrationen im Medium führen zu einer Verdoppelung der Guanylatzyklaseaktivität und Erhöhung des intrazellulären cGMP. Bei pharmakologischen Biotinkonzentrationen im Medium erhöht sich die Konzentration der RNA-Polymerase II (SINGH u. DAKSHINAMURTI, 1988).

1.5 Plasma- und Milchbiotinspiegel

Biotin wird im Allgemeinen als gut verträgliche Substanz ohne bekannte Nebenwirkung bei Mensch und Labortieren anerkannt (BONJOUR, 1991). Es zeigt laut BITSCH und BARTEL (1994) im Tierversuch nur eine geringe akute, subchronische und chronische Toxizität.

Biotin ist gegen einen Konzentrationsgradienten plazentagängig (BITSCH u. BARTEL 1994). Der mittlere Biotingehalt in der Kuhmilch liegt bei 13-34,9 µg/l und bei biotinsupplementierten Kühen im Mittel bei 80-138,7 µg/l (HOCHSTETTER, 1998; KLÜNTER u. STEINBERG, 1993; BONJOUR, 1991).

Der Plasmabiotinspiegel beim Rind liegt zwischen 300 und 800 ng/l (SCHMID, 1995; FRIGG et al., 1993). Eine orale Zufuhr von 20 mg/Tag erhöht den Plasmaspiegel beim Rind auf 3000-8000 ng/l (FRIGG et al., 1993). SCHMID (1995) und FRIGG et al. (1993) konnten zudem zeigen, dass dieser erhöhte Biotinspiegel im Plasma während der gesamten Zeit der Supplementierung nachweisbar war. Der Plasmabiotinspiegel sank nach Beendigung der Biotinzugaben wieder ab.

1.6 Biotinmangel

Bei einem Biotinmangel kommt es zu einer verminderten Aktivität der biotinabhängigen Enzyme (MOCK, 1996; FRIEDRICH, 1987; CAREY u. MORRIS, 1977; CHIANG u. MISTRY 1974). Dies wirkt sich negativ auf die jeweiligen Stoffwechselprozesse aus. Es kommt zu einer Verringerung der Gluconeogenese und der Lipogenese mit Folgestörungen. Die durch verminderte Acetyl-CoA-Carboxylaseaktivität verlangsamte Lipogenese z.B. hat eine Störung in der Fettsäuresynthese zur Folge (PROUD et al, 1990; WHITEHEAD, 1988; DONALDSON, 1981). So wurde in der Haut von Geflügel bei Biotinmangel eine Abnahme der anfärbbaren Lipide im Stratum corneum beobachtet (WHITEHEAD, 1988). Proud et al (1990) stellten unter Biotinmangel eine Abnahme des Gesamtlipidgehaltes in der Rattenhaut fest.

Biotinmangelsymptome sind beim Menschen und verschiedenen Tierarten, z.B. Hühnern (WÄSE, 1999; WÄSE et al., 1997; FRIGG u. TORHORST, 1980;

Literaturübersicht

FRIGG u. BRUBACHER, 1976), Schweinen (KOPINSKI u. LEIBHOLZ, 1989; GEYER et al., 1984 und 1981; GLÄTTLI et al., 1975; POHLENZ, 1974) und Kälbern (MÜLLING et al., 1999; WHITEHEAD, 1988) ausführlich beschrieben worden. Allen gemeinsam sind Symptome der Haut (mattes Fell, Alopezie bis hin zur Dermatitis), verminderte Wachstumsgeschwindigkeiten bei Jungtieren und verminderte Hornqualitäten an Krallen, Hufen und Klauen (BITSCH u. BARTEL 1994; WHITEHEAD, 1988).

1.7 Biotinbehandlung

Studien über Behandlungen mit Biotin ergaben positive Effekte auf Huf- und Klauengesundheit. LEU (1987) konnte zeigen, dass sich der Hufstatus bei **Pferden** nach 9 und 15 Monaten deutlich verbesserte. Es wurde zudem festgestellt, dass Biotin dabei keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Hornwand nimmt. In früheren Untersuchungen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (WINTZER, 1986; COMBEN et al., 1984). BUFFA et al. (1992) fanden ebenso eine Hornqualitätsbesserung, aber im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen auch eine gesteigerte Wachstumsrate vom Hufhorn. GEYER und SCHULZE (1994) untersuchten bis zu sechs Jahren den Hufstatus von Pferden und Ponys. Sie fanden makroskopische und histologische Verbesserung im Hufstatus, ebenso in der Zugfestigkeit des Horns. JOSSEK et al. (1995) und ZENKER et al. (1995) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen.

POHLENZ (1974) berichtete in einer Zusammenfassung über Biotinmangelversuche beim **Schwein** von einer deutlichen Besserung der Symptome durch eine Biotinbehandlung. Es kam zur Haarneubildung, die Schuppenbildung der Haut nahm ab und Pusteln heilten wieder. Weitere Untersuchungen über die Behandlung von Schweinen mit Biotin zeigten unter anderem eine Verbesserung der Klauenqualität. Dabei wurde festgestellt, dass das Klauenhorn fester und härter wird. Die Häufigkeit von Klauenerkrankungen wurden bei Biotinsupplementation weniger (BRYANT et al., 1985; WEBB et al., 1984; BROOKS et al., 1977). Ein Einfluß von Biotin auf die Wachstumsrate des Klauenhorns wurde nicht festgestellt (JOHNSTON u. PENNY, 1989).

Untersuchungen zur Biotinwirkung beim **Rind** kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

DISTL und SCHMID (1994) stellten einen positiven Effekt auf Entzündungen im Klauenzwischenraum nach zwei Monaten Biotinsupplementierung (20 mg/Tier/Tag) fest, nach vier Monaten auch auf die Häufigkeit und Schwere von Sohlenquetschungen. Nach 11 Monaten Biotingabe konnten sie eine signifikante Verbesserung der Klauengesundheit feststellen. DISTL und SCHMID (1994) erklärten diese Verbesserung mit der Feststellung, dass die Klauenhornhärte unter Biotin zunahm, dies zu veränderten Klauenmaßen führte und so druckempfindliche Partien der Lederhaut besser vor Traumatisierungen geschützt seien. Innerhalb von vier Monaten (Biotingabe 10 mg/Tier 2x am Tag) wurden palpatorisch feststellbare Verfestigungen des Ballenhorns beobachtet (SCHMID, 1995). Nach insgesamt 11 Monaten Biotinsupplementierung stellte SCHMID (1995) fest, dass die Klauengesundheit besser, das Hornwachstum nicht gestiegen war und entgegen DISTL und SCHMID (1994) die Hornhärte nur leicht im Bereich des Kronhorns anstieg. HOCHSTETTER (1998) stellte ebenfalls eine verbesserte Klauengesundheit an den Hinterklauen von Kühen nach Biotinzufütterung (20 mg /Tier/Tag) fest. Sie fand unter anderem makroskopisch sichtbare Veränderungen in der Zusammensetzung der interzellulären Kittsubstanz. Sie führte diese Veränderungen auf den Einfluss von Biotin auf den Energie- und Fettstoffwechsel der Keratinozyten zurück. An den Vorderklauen konnte HOCHSTETTTER (1998) keine Verbesserung der Klauengesundheit feststellen. Den Unterschied zwischen den Vorder- und Hinterklauen führt sie auf die unterschiedliche Belastung in der Anbindehaltung zurück. FITZGERALD et al. (2000) untersuchten auf 20 Farmen 2705 Kühe unter anderem auf Lahmheit und Antibiotika-Gaben bei Klauenerkrankungen. Auf 10 Farmen (1305 Tiere) wurde 20 mg/Tier/Tag Biotin zugefüttert. Nach 13 Monaten reduzierte sich die Häufigkeit von Lahmheiten und der Einsatz von Antibiotika bei den biotinsupplementierten Tieren. In weiteren Untersuchungen wurde die Verbesserung der Klauengesundheit nach Biotinsupplementierung (20 mg/Tier/Tag) bestätigt (HEDGES et al., 2001). Dabei wurden unter anderem auch die Milchleistung und Milchezusammensetzung untersucht (BERGSTEN et al., 2003; FITZGERALD et al., 2000). HIGUCHI et al. (2004) fanden zudem einen höheren Gesamtlipidgehalt im Sohlenhorn von biotinsupplementierten Kühen.

Literaturübersicht

Keine Verbesserung der Hornqualität stellte HUNKELER (1996) bei biotinsupplementierten (20 mg/Tag) Kühen fest. Sie untersuchte 160 Kühe aus 82 verschiedenen Betrieben über 6 Monate und konnte nur einen positiven Effekt von Biotin auf die durchschnittliche Überhornungszeit bei Klauengeschwüren nachweisen. Diese verkürzte sich um 10 Tage (von im Durchschnitt 42 auf 32 Tage). KOLLER (1998) konnte bei einer Biotingabe von 2x 20 mg/Tag über 50 Tage ebenfalls keine wesentlichen, makroskopisch sichtbaren Verbesserungen der Klauengesundheit feststellen. Er fand allerdings mikroskopische Verbesserungen in der Hornqualität (KOLLER, 1998; KOLLER et al., 1998). Er konnte vor allem in den tieferen Schichten der Epidermis wesentliche Verbesserungen (weniger Mikrorisse, weniger Zerfall oder Ablösung von Hornzellen und seltener Röhren mit erweiterten Markräumen) nachweisen. EGGERS (2001) untersuchte den Einfluss von Biotin (20 mg/Tier 2x am Tag) auf den Heilungsverlauf von Klauengeschwüren über 50 Tage. Sie konnte keinen signifikanten Unterschied im Heilungsverlauf zwischen biotinsupplementierten Kühen und den Kontrollkühen feststellen. Sie schlußfolgerte, dass die positive Wirkung von Biotin von einer leistungsfähigen Durchblutung des Gewebes abhängig ist. LISCHER et al. (2002) konnten auch keinen Unterschied im Heilungsverlauf von Klauengeschwüren feststellen. Nach 50 Tagen waren alle Klauengeschwüre verheilt, unabhängig von der Biotingabe (40 mg/Tier/Tag). Sie fanden jedoch histologische Unterschiede. Bei den biotinsupplementierten Kühen wurde eine Verbesserung in den tieferen Gewebeschichten festgestellt. Sie kamen zu dem Schluß, dass Biotin einen positiven Einfluß auf die Heilung von Klauengeschwüren hat, dies aber nach relativ kurzer Zeit (50 Tage) makroskopisch noch nicht sichtbar sei.

2 Anatomische Grundlagen

Das Zehenendorgan des Rindes besteht an jeder Gliedmaße aus zwei Hauptklauen (Digitus tertius und Digitus quartus) mit denen das Rind fußt und zwei Afterklauen (Digitus secundus und Digitus quintus). Letztere haben keine knöcherne Verbindung mit dem Extremitätenskelett. In dem Afterklauenhornschuh steckt eine spitzdreikantige Endphalanx, die gelenkig mit einer rudimentären Phalanx II verbunden ist (KOCH, 1992). In dieser Arbeit

werden im weiteren die Hauptklauen als Klauen benannt, da an diesen die Untersuchung erfolgt.

2.1 Definition der Klaue

Die Klaue ist das Zehenendorgan (ZIETZSCHMAN, 1918) mit Hautüberzug, dessen Epidermis den verhornten Klauenschuh bildet. Das Zehenendorgan umfasst den Hornschuh mit den enthaltenen zentralen Stützstrukturen. Zu den zentralen Stützstrukturen werden das Klauenbein, der distale Abschnitt des Kronbeines, das Strahlbein, der Bandapparat der Gelenke, die Endabschnitte der Streck- und Beugesehne und die Bursa podotrochlearis gezählt (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; HABERMEHL, 1984; WILKENS, 1963; GEGENBAUER, 1885). Dies entspricht der Definition der Klaue von HOHMANN (1902). Er versteht darunter den Hornschuh mitsamt allen von ihm eingeschlossenen Teilen. Die Klaue im engeren Sinne ist der Hornschuh, der durch die Verhornung aus den Epidermiszellen hervorgeht (GEGENBAUER, 1885).

2.2 Einteilung der Klaue in Segmente

Der **Hautüberzug** der Klaue besteht aus den drei Schichten der äußeren Haut: Klauenunterhaut (Subkutis), Klauenlederhaut (Dermis) und Klauenoberhaut (Epidermis).

Aufgrund von strukturellen Unterschieden in den Hautschichten wird die Klaue in fünf Segmente unterteilt (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; DYCE et al., 1991, KÜNZEL, 1990; HABERMEHL, 1984; WILKENS, 1963). In proximodistaler Richtung schließt sich der behaarten Haut das **Saumsegment** an. Dem folgt direkt das **Kronsegment** und danach das **Wandsegment**. Die verhornte Epidermis dieser drei Segmente schiebt sich in proximodistaler Richtung übereinander und bildet die Hornplatte. Diese ist gebogen und bildet dorsal eine abgerundete Kante (HABERMEHL, 1984). An der Palmar- bzw. Plantarfläche lassen sich zwei weitere Segmente unterscheiden. Das **Ballensegment** schließt sich direkt der behaarten Haut an und steht dorsal mit dem Saumsegment in Verbindung. Distal grenzt das Ballensegment an das Sohlensegment. Der an der Zehenspitze liegende Sohlenkörper und je ein axialer und abaxialer schmaler Schenkel bilden das **Sohlensegment** (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; DYCE et al., 1991). Die beiden

Literaturübersicht

letzten genannten Segmente bilden zusammen mit der Hornplatte den verhornten Klauenschuh (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; HABERMEHL, 1984; WILKENS, 1963). FÜRST (1992) nennt als sechstes Segment das **Zwischenklauensegment**. Dies verbindet beide Klauen miteinander, es geht axial in das Saumsegment und palmar/plantar in das Ballensegment über.

Im **Saumsegment** bildet die Subkutis das Saumpolster, dies verbreitert sich und geht palmar/ plantar in das Ballenpolster über. Der Subkutis liegt die Dermis auf. Diese trägt im Saumsegment, ebenso wie im Kron-, Sohlen- und Ballensegment, Zöttchen (FÜRST, 1992; HABERMEHL, 1984; WILKENS; 1963). Die Dermis tritt mit der Subkutis als Saumwulst in Erscheinung. Distal an der Grenze zum Kronsegment ist die Umschlagstelle der Saumlederhaut als deutliche Falz sichtbar (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; FÜRST, 1992). Das weiche Saumhorn besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel und bildet über den Lederhautzotten Hornröhrchen aus.

Das **Kronsegment** schließt sich distal an das Saumsegment an. Die Subkutis bildet hier das schwach gewölbte Kronpolster aus, welches nach palmar/plantar an Dicke abnimmt (FÜRST, 1992; WILKENS, 1963). Die Dermis liegt dem Kronpolster auf und wird als breiter, flacher Kronwulst hervorgewölbt. Am Übergang zur Wandlederhaut sind niedrige, mit feinen Zöttchen besetzte Leisten erkennbar (BUDRAS u. WÜNSCHE, 2002; HABERMEHL, 1984). Die Epidermis bildet hier widerstandsfähiges, sehr hartes Kronhorn, das die Schutzschicht der Hornwand darstellt (FÜRST, 1992).

Im **Wandsegment** fehlt ein Subkutispolster (KÜNZEL, 1990; DIRKS, 1985; WILKENS, 1963). WILKENS (1963) beschreibt die Subkutis als einen Teil des Periosts des Klauenbeines. Nach neueren Untersuchungen fehlt die Subkutis im Wandsegment der Rinderklaue (WESTERFELD, 2003). Die Dermis trägt im Wandsegment Blättchen (BUDRAS et al., 1996; FÜRST, 1992; HABERMEHL, 1984). Das von der Epidermis gebildete Wandhorn ist in Blättchen und nicht in Röhrchen angeordnet (FÜRST, 1992). HABERMEHL (1984) beschreibt die Hornproduktion im Wandsegment als gering. BUDRAS et al. (1996) fanden heraus, dass die Hornproduktion besonders an der Grenze zum Sohlensegment

intensiv ist. Am Tragrand der Klaue bildet das Wandhorn die weiße Linie (Zona alba) (MÜLLING, 1993; FÜRST, 1992; HABERMEHL, 1984).

Das **Ballensegment** stellt den Großteil der Fußungsfläche dar. Es besteht nach FÜRST (1992) aus drei verschiedenen Teilen: dem proximalen Teil, der ähnlich dem Saumsegment ist, dem mittleren Teil mit ballenspezifischen Merkmalen, auch Ballenwulst genannt und dem den Sohlensegment ähnlichen apikalen Anteil. MÜLLING (1993) teilt das Ballensegment in einen proximalen und einen distalen Abschnitt aufgrund unterschiedlicher Anordnung und Ausprägung der Lederhautpapillen, sowie der unterschiedlichen Hornhärte.

Die Subkutis hat im proximalen Ballensegment die größte Ausdehnung. Sie ist reich an elastischen Fasern, Fetteinlagerungen und lockerem Bindegewebe (FÜRST, 1992; HOHMANN, 1902). Das von ihr gebildete Ballenpolster besteht aus speziell ausgerichteten Bindegewebssträngen, die den Ballen in Kompartimente unterteilen (RÄBER, 2000). Das Ballenpolster wirkt bei Belastung stoßbrechend (HABERMEHL, 1984) und nimmt die Druckkräfte auf, um sie mit dem Ballenhorn zusammen als funktionelle Einheit weiterzuleiten (WESTERFELD, 2003). Die Dermis liegt dem Ballenkissen auf und trägt Zöttchen in unregelmäßiger Anordnung und unterschiedlichen Formen (MÜLLING, 1993; FÜRST, 1992). Die Epidermis bildet proximodistal durch Verhornung das Ballenhorn. Das Horn hat zwischen den Schenkeln des Sohlensegments (distales Ballensegment) eine harte und nach kaudal (proximales Ballensegment) hin eine weiche Konsistenz (MÜLLING, 1993; HABERMEHL, 1984). DYCE et al. (1991) beschreiben die Konsistenz des Ballenhorns als relativ weich, was aber funktionell durch die beträchtliche Dicke ausgeglichen werde.

Im **Sohlensegment** wird als ein charakteristisches Merkmal das Fehlen der Subkutis beschrieben (WESTERFELD, 2003; MÜLLING, 1993; FÜRST, 1992; KÜNZEL, 1990). Dagegen beschreibt HABERMEHL (1984) eine dünne Subkutis, die dem Klauenbein direkt anliegt. Die Sohlenlederhaut ist sehr schmal und trägt Zotten, die reihenförmig angeordnet sind. Das helle und widerstandsfähige Sohlenhorn (FÜRST, 1992) wird durch Verhornung der oberflächlichen Zellschichten der Epidermis gebildet. Es werden zwei schmale

Literaturübersicht

Schenkel entlang der weißen Linie entwickelt. Das Sohlenhorn ist schwer vom Ballenhorn zu unterscheiden, vor allem an ungepflegten Klauen (HABERMEHL, 1984).

3 Keratinisierung und Verhornung

Die Keratinisierung ist eine Leistung spezialisierter Zellen (Keratinocyten) und kommt auch in nicht verhornenden, mehrschichtigen Epithelien vor (KÜNZEL, 1990). Beim verhornenden, mehrschichtigen Epithel ist die Keratinisierung Voraussetzung für die Verhornung der Keratinocyten, an deren Ende die tote Hornzelle steht (TOMLINSON et al., 2004; BUDRAS et al., 1998). Die Keratinisierung beginnt im Stratum basale der Epidermis mit der Zellvermehrung. Im Stratum spinosum kommt es zur intrazellulären Synthese spezifischer Produkte, z.B. der Zytokeratine, der Keratinfilament assoziierten Proteine, der intrazellulären Lipide und der Membran-Coating-Granules (TOMLINSON et al., 2004; LIEBICH, 1999; MENON et al., 1986; MATOLTSY, 1975). In weiteren Differenzierungsschritten kommt es zur Verhornung der Keratinocyten bei vorprogrammiertem Zelltod. Durch intrazelluläre Anlagerung von spezifischen Proteinen entsteht eine verstärkte Zellmembran (cornified cell envelope). Die Membran-Coating-Granules geben ihren Inhalt in den Interzellularspalt ab. Es kommt zu einem festen Zusammenhalt zwischen den Hornzellen. Gleichzeitig findet ein enzymatischer Abbau der Zellorganellen statt. Die vollständig verhornten Keratinocyten (tote Hornzellen) bilden das Stratum corneum (TOMLINSON et al., 2004; AKIYAMA et al., 2002; BUDRAS et al., 1998; DALE et al., 1993; PELLMANN et al., 1993; KÜNZEL, 1990; DIRKS, 1985; LANDMANN, 1980; MATOLTSY, 1975).

3.1 Verhornungstypen

In der Literatur werden zwei Arten der Verhornung unterschieden. Die weiche und die harte Verhornung. Die Anwesenheit oder das Fehlen eines Stratum granulosum gilt als ein strukturelles Unterscheidungsmerkmal (KÜNZEL, 1990; LARSSON et al., 1956; WARD u. LUNDGREN, 1954).

Bei der weichen Verhornung ist vor dem Stratum corneum ein Stratum

granulosum ausgebildet. Die Zellen des Stratum granulosum sind gekennzeichnet durch das Auftreten von meist basophilen Granula ohne Membrangrenzung, den Keratohyalin granula (BUDRAS et al., 1996; KÜNZEL, 1990; MÜLLING, 1993; LARSSON et al. 1956; WARD u. LUNDGREN, 1954). Bei der harten Verhornung fehlt ein Stratum granulosum. Das Stratum spinosum geht unter Ausbildung einer keratogenen Zone direkt ins Stratum corneum über (BUDRAS et al., 1996; GIROUD u. LEBLOND, 1951). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Verteilung von Lipiden in der Epidermis. Im Stratum spinosum und auch im Stratum corneum treten bei der weichen Verhornung mit Sudanschwarz anfärbbare Lipide auf. Bei der harten Verhornung sind die Lipide nur im Stratum spinosum nachweisbar (GIROUD u. LEBLOND, 1951).

An der Rinderklaue sind beide Arten der Verhornung anzutreffen. Die weiche Verhornung ist im proximalen Ballensegment und im Saumsegment vertreten (HABERMEHL, 1994; MÜLLING, 1993; FÜRST, 1992; WILKENS, 1963). Ebenso ist sie im epidermalen Überzug der Terminalpapillen im Wandsegment vorhanden, da in diesem Bereich des Wandsegments ein Stratum granulosum nachgewiesen wurde (MÜLLING, 1993). Im distalen Ballen-, Kron-, Sohlen- und dem Rest des Wandsegmentes verhornt die Epidermis nach dem Prinzip der harten Verhornung (MÜLLING et al., 1994; HABERMEHL, 1994; MÜLLING, 1993; FÜRST, 1992).

Die verhornte Epidermis bildet eine schützende Hülle. Sie besitzt mechanische Eigenschaften (DALE et al., 1993) und stellt eine Permeabilitätsbarriere dar. Die Hornschicht schützt den Organismus unter anderem vor Wasserverlust bzw. hoher Wasseraufnahme, sowie vor eindringenden Infektionen (SCAIFE et al., 2000; ELIAS et al., 1979).

4 Hornqualität

Hornqualität kann nicht einheitlich für die Klaue definiert werden, da die Klauensegmente beim Fußen unterschiedlichen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind (SCHMID, 1995; MÜLLING et al., 1994).

Literaturübersicht

Es werden einige Parameter zur Erfassung der Hornqualität in der Literatur beschrieben. Unter anderem die Anordnung in Zwischenröhrchen- und Röhrchenhorn, die Hornhärte, die Zugfestigkeit und der Wassergehalt (BUDRAS u. PATAN, 2003; PATAN u. BUDRAS, 2003; PATAN, 2001; SCHMID, 1995; DISTL u. SCHMID, 1994; MÜLLING, 1993; PELLMANN et al. 1993; ZENKER, 1991; FÜRST, 1992; DIRKS, 1985; DIETZ u. PRIETZ; 1981).

Diese Parameter werden von Faktoren beeinflusst, die in drei Faktorengruppen eingeteilt werden können (MÜLLING et al., 1994; MÜLLING, 1993; PELLMANN et al. 1993).

1. Architektur des Hornzellverbandes
2. Intrazelluläre Faktoren
3. Interzelluläre Faktoren

4.1 Architektur des Hornzellverbandes

Die Hornqualität wird mitbestimmt durch die Anordnung in Zwischenröhrchen- und Röhrchenhorn mit Mark und Rinde, sowie Anzahl, Größe und Aufbau der Hornröhrchen (MÜLLING, 1993). DIETZ und PRIETZ (1981) kamen zu dem Schluss, dass die Anzahl und Wandstärke der Hornröhrchen sowie der Durchmesser des Markraumes die Härte des Klauenhorns bestimmen. Sie stellten fest, dass bei widerstandsfähigerem Klauenhorn die Anzahl der Hornröhrchen pro Flächeneinheit höher, die Hornröhrchenrinde dicker und der Hornröhrchenmarkraum kleiner ist im Vergleich zum weniger widerstandsfähigen Klauenhorn. PELLMANN et al. (1993) hingegen stellten fest, dass im weniger festen Ballenhorn die dünnen Hornröhrchen mit schmaler Rinde zahlreicher vorhanden sind als im festen Kronhorn. Im Kronhorn fanden sie eine geringere Anzahl größerer Hornröhrchen mit dickerer Rinde. Auch nach BUDRAS und HUSKAMP (1995) ist die Belastbarkeit des Röhrchenhorns nicht von der Anzahl der Hornröhrchen abhängig, sondern vor allem von der Dicke und dem Verhältnis Röhrchen- zu Zwischenröhrchenhorn.

Nach KOLLER (1998), SCHMID, (1995) und ZENKER (1991) stellen

Mikrorisse und erweiterte Markräume Merkmale für schlechte Hornqualität und somit verminderte Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit gegen mechanische und mikrobielle Noxen dar. Dass Markzellen (im Röhrenchorn von Przewalski-Pferden) neben der Weite der Markräume ein zusätzliches Merkmal der Hornqualität darstellen, zeigten BUDRAS und SCHIEL (1996). Sie konnten nachweisen, dass die Markzellen die Permeabilität und somit die Barriere gegen aufsteigende bakterielle Infektionen mit beeinflussen.

4.2 Intrazelluläre Faktoren

Für die Hornqualität bedeutsame intrazelluläre Faktoren sind die Keratinfilamente und die Keratinfilament-assoziierten Proteine (MÜLLING et al., 1994; PELLMANN et al., 1993).

Die Keratinfilamente aus der Gruppe der Intermediärfilamente sind an der Ausbildung des Zytoskelettes der Epidermiszellen beteiligt (BUDRAS et al., 1998; GROSENBAUGH u. HOOD, 1992). Die für die Epidermiszellen charakteristischen Keratinproteine, auch Zytokeratin oder α -Keratin genannt, sind die Grundbausteine der Keratinfilamente (FUCHS u. CLEVELAND, 1998; SUN u. GREEN, 1978). Sie werden anhand ihres Molekulargewichtes (gemessen in Kilodalton) und ihres isoelektrischen Punktes klassifiziert (KARTENBECK u. FRANKE, 1993; MOLL et al., 1982). Die Molekulargewichte für Keratinproteine liegen laut Literaturangaben zwischen 40-70 kDa (HOCHSTETTER, 1998; STEINERT et al., 1984; MOLL et al. 1982). Die Keratinfilamente (Intermediärfilamente) bestehen aus mehreren Proteinen. Die Synthese beginnt mit der Ausbildung von Präkeratinfilamenten, die sich ab dem Stratum spinosum in Bündel (meist als Tonofibrillen bezeichnet) zusammenlagern. Bis zum Stratum corneum kommt es zu einer Zunahme des Filamentbündeldurchmessers durch weitere Bündelung der Filamente. Nicht-kovalente Bindungen in Form von Ionenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen stabilisieren die entstehenden Keratinfilamentbündel. (COULOMBE u. FUCHS, 1990; KÜNZEL, 1990; STEINERT, 1990; AEBI et al., 1983).

Die Keratinfilament-assoziierten Proteine, die neben den Keratinfilamenten synthetisiert werden, zeigen eine weniger geordnete Struktur (BUDRAS et al.,

Literaturübersicht

1989; MATOLTSY, 1975). In der verhornten Zelle verbacken die Keratinfilament-assoziierten Proteine mit den Keratinfilamentbündeln (BUDRAS u. SEIDEL, 1992; BUDRAS et al., 1989). Durch Ausbildung von Disulfid-, Wasserstoffbrücken, sowie Ionenbindungen und van-der-Waals-Kräfte tragen die Keratinfilament-assoziierten Proteine zur Bündelung der Keratinfilamente bei (FROHNES u. BUDRAS, 2001; BRAGULLA et al., 1994). Sie tragen so zur Stabilisierung der interfibrillären Matrix bei und begrenzen die Verformung des Netzwerkes aus Keratinfilamenten, was für eine Festigkeit der Hornzelle sorgt (MATOLTSY, 1976 und 1975).

Die intrazelluläre Synthese von Membrane Coating Granules (MCG) und dem Membrane Coating Material (MCM), das einzig bekannte Sekretionsprodukt der Epidermiszelle (WOLF u. WOLF-SCHREINER, 1976), wird nachfolgend unter 4.3 Interzelluläre Faktoren erläutert.

4.3 Interzelluläre Faktoren

Das Membrane Coating Material (MCM), auch Interzellularkitt genannt (BUDRAS u. BRAGULLA, 1991), gilt als der wichtigste interzelluläre Faktor im Zusammenhang mit der Hornqualität (ANTHAUER et al., 2005; ANTHAUER, 1996; PELLMANN et al., 1993; BUDRAS u. BRAGULLA, 1991). Ein bildlicher Vergleich mit einem Mauerwerk verdeutlicht die Bedeutung des MCM (Membrane Coating Material). Bei diesem Vergleich stehen die Ziegelsteine für die Hornzellen und der Mörtel für das MCM (MÜLLING, 1993; LANDMANN., 1988; ELIAS, 1981).

Die meisten Untersuchungen des MCM wurden an der menschlichen oder tierischen Haut durchgeführt (PONEC et al., 2003; HAMANAKA, 2002; WEERHEIM u. PONEC, 2001; WERTZ, 2000; WERTZ et al., 1989 und 1986; LANDMANN, 1988 und 1986; ELIAS et al., 1979; MATOLTSY, 1976 und 1975). In neueren Untersuchungen werden auch die Zehenendorgane vor allem von Pferd, Rind und Hund berücksichtigt. (ANTHAUER et al., 2005; HIGUCHI et al., 2005 und 2004; BUDRAS u. PATAN, 2003; KÖNIG u. BUDRAS, 2003; EGGERS, 2001; PATAN, 2001; SCAIFE et al., 2000; HOCHSTETTER, 1998; MÜLLING u. BUDRAS, 1998; SEIDEL, 1992; BUDRAS u. BRAGULLA,

1991).

Die Funktion des MCM wird aufgrund des Lipidanteils vor allem in einer Permeabilitätsbarriere der Haut gesehen, (HIGUCHI et al., 2005; WERTZ, 2000; MÜLLING u. BUDRAS, 1998; BUDRAS u. BRAGULLA, 1991; LANDMANN, 1988; ELIAS, 1981). In Bezug auf die Rinderklaue (MÜLLING, 1993), den Pferdehuf (ANTHAUER et al. , 2005; BUDRAS u. BRAGULLA, 1991) und die Hundekralle (SEIDEL, 1992) wird die Sicherung einer festen, mechanischen Verbindung zwischen den Hornzellen als die wichtigste Funktion angesehen.

Das MCM wird vom rauhen endoplasmatischen Reticulum und vom Golgiapparat in den keratinisierenden Stachelzellen des Stratum Spinosum gebildet (ANTHAUER et al. , 2005; WERTZ, 2000; MÜLLING u. BUDRAS, 1998; LANDMANN, 1980; HAYWARD, 1979). An dieser Stelle werden von mehreren Untersuchern in der Epidermis Granula mit einer dreischichtigen Hüllmembran und einer lamellären inneren Struktur beschrieben (LANDMANN, 1980; HAYWARD, 1979; LAVKER, 1976; MATOLTSY, 1976; MATOLTSY u. PARAKKAL, 1965). Es wurden mehrere Bezeichnungen für diese Granula verwendet. Die von MATOLTSY und PARAKKAL (1965) eingeführte Bezeichnung Membrane Coating Granules (MCG) hat sich bis heute durchgesetzt. Die MCGs (Membrane Coating Granules) beinhalten das MCM (ANTHAUER et al., 2005; WERTZ, 2000; MÜLLING u. BUDRAS, 1998).

In den oberen Zellschichten des Stratum spinosum kommt es zu einer Anlagerung der MCGs an die Zellmembran und einer Exozytose des Inhaltes der MCGs. Das MCM wird in den Interzellularraum abgegeben (ANTHAUER et al., 2005; WERTZ, 2000; MÜLLING u. BUDRAS, 1998; MÜLLING, 1993; LANDMANN 1986 und 1980; HAYWARD u. HACKEMANN, 1973; MATOLTSY u. PARAKKAL, 1965).

Der Inhalt der MCGs besteht aus Glycoproteinen und zum großen Teil aus polaren Lipiden, vor allem Phospho- und Glykolipiden. Histochemisch nachgewiesene Phospholipide sind in der Lage Lipid-Bilayer zu bilden. Die Ultrastruktur der MCGs aus übereinandergeschichteten Lamellenstapeln ist mit der Ultrastruktur solcher Lipid-Bilayer vergleichbar (KÖNIG u. BUDRAS, 2003;

Literaturübersicht

LANDMANN, 1986; ELIAS, 1981; HAYWARD, 1979). WERTZ und DOWNING (1983 und 1982) sind der Meinung, dass Glykolipidmoleküle die molekulare Grundlage für die Stapelung der Membranen in den MCGs bilden. Sie fanden in der Haut von Schweinen einen hohen Anteil an Acylglucosylceramiden, aufgebaut aus Sphingosin, Glukose und langkettigen Fettsäuren. Dieses Molekül besitzt strukturbildende Eigenschaften, womit es in der Lage sei, die Membranstapel zusammenzuhalten (LANDMANN, 1988; WERTZ u. DOWNING, 1982). In späteren Untersuchungen an der Haut wurden vor allem Ceramide, Cholesterin und Fettsäuren nachgewiesen (PONEC et al., 2003; WEERHEIM u. PONEC, 2001; WERTZ, 2000). SCAIFE et al. (2000) untersuchten das Horn vom Pferdehuf und der Rinderklaue. Sie fanden unter anderem ebenso Ceramide, Cholesterin und Fettsäuren. HIGUCHI et al. (2005) untersuchten das Wand- und Sohlensegment der Rinderklaue. Sie stellten Unterschiede in dem Gesamtgehalt von Ceramiden zwischen gesunden und kranken Klauen fest. Dabei fanden sie bei den gesunden Kühen einen höheren Anteil an Ceramiden, als bei den erkrankten Tieren.

Eine weitere intrazelluläre Komponente neben der lamellären Struktur der MCGs wird als amorph, feinflockig oder feinkörnig beschrieben (ANTHAUER et al., 2005; KÖNIG u. BUDRAS, 2003; LANDMANN, 1980; HAYWARD u. HACKEMANN, 1973). Histochemische Nachweise belegen einen Kohlenhydratanteil. ELIAS et al. (1979) führten diesen Kohlenhydratanteil auf die Glykolipide zurück, während HAYWARD (1979) sowie HAYWARD und HACKEMANN (1973) ihn den Glykoproteinen zuschreiben.

ANTHAUER (1996) stellte am Huf eine segmentabhängige Verteilung der beiden Komponenten in den MCGs fest. Sie wies im Horn des Sohlen- und Ballensegmentes einen höheren Anteil der Lipidkomponente nach, während im Horn des Kron- und Saumsegmentes der Anteil der Kohlenhydratkomponente überwog. MÜLLING und BUDRAS (1998) konnten für die Klaue ebenfalls ein segmentspezifisches Muster in der Verteilung der zwei beschriebenen Komponenten nachweisen. In allen Segmenten fanden sie Glykoproteine, während die komplexen Lipide nur im Saumsegment und in axial gelegenen Teilen

des Ballensegmentes vorkamen. In der Epidermis des Kron-, Sohlen- und Wandsegmentes hingegen fehlte die Lipidkomponente.