

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der freien Universität Berlin
Laboratorium Prof. Dr. K.-D. Budras

In Zusammenarbeit mit der
Veterinär-chirurgischen Klinik
der Universität Zürich
Direktor Prof. Dr. J. A. Auer

**DIE WUNDHEILUNG DES RUSTERHOLZSCHEN KLAUENGESCHWÜRES
BEIM RIND**

**Licht- und transmissionselektronenmikroskopische Auswertung einer
kontrollierten klinischen Studie zur Wundheilung und zum Einfluss von Biotin
auf den Heilungsverlauf**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tina Eggers
Tierärztin aus Itzehoe

Berlin 2001

Journal-Nr. 2504

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. K.-D. Budras
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. J. A. Auer (Zürich)

Tag der Promotion: 16.07.2001

Gefördert durch Fa. Hoffmann-LaRoche AG, Basel (Schweiz)

Meinen lieben Eltern,

INHALTSVERZEICHNIS

		<u>Seite</u>
A	EINLEITUNG	13
B	LITERATURÜBERSICHT	15
1	<u>Die Klaue</u>	15
1.1	Die äußere Haut von Mensch und Tier	15
1.2	Definition und Übersicht über den Bau der Klaue, sowie ihre Gliederung nach Schichten und Segmenten	16
1.2.1	<u>Definition der Klaue</u>	16
1.2.2	<u>Gliederung nach Schichten</u>	16
1.2.3	<u>Gliederung nach Segmenten</u>	16
1.3	Struktur der Klaue im Bereich des Ballens	18
1.3.1	<u>Klauenbein</u>	18
1.3.2	<u>Unterhaut (Subkutis)</u>	18
1.3.3	<u>Ballenlederhaut (Dermis)</u>	19
1.3.4	<u>Dermoepidermaler Übergang (Basalmembran)</u>	19
1.3.5	<u>Oberhaut (Epidermis)</u>	20
1.3.6.1	<i>Stratum basale</i>	21
1.3.6.2	<i>Stratum spinosum</i>	21
1.3.6.3	<i>Stratum granulosum</i>	22
1.3.6.4	<i>Verhornungsgrenze</i>	23
1.3.6.5	<i>Stratum corneum mit jungen und älteren Hornzellen</i>	23
1.4	Vorgang der Hornbildung	24
1.4.1	<u>Definitionen "Keratinisierung" und "Verhornung"</u>	24
1.4.2	<u>Keratine und andere spezifische Syntheseprodukte der verhornenden Epidermiszellen</u>	24
1.4.2.1	<i>Keratine</i>	24
1.4.2.2	<i>Intermediärfilament-assoziierte Proteine und Keratohyalin granula</i>	27
1.4.2.3	<i>Membrane coating material in membrane coating granules</i>	28
1.4.2.4	<i>Marginales Band und cornified cell envelope</i>	29

2	<u>Die Wundheilungsvorgänge an der äußeren Haut</u>	30
2.1	Ziele und Definition der Wundheilung	30
2.2	Verletzung, Insult	31
2.3	Blutstillung, Hämostase	32
2.4	Entzündung	33
2.5	Proliferation	35
2.5.1	<u>Fibroplasie</u>	35
2.5.2	<u>Blutgefäßneubildung</u>	36
2.5.3	<u>Wundkontraktion</u>	36
2.5.4	<u>Reepithelialisation bzw. epidermale Regeneration</u>	37
2.6	Reifung und Umformung	38
3	<u>Das RUSTERHOLZsche Klauengeschwür</u>	39
3.1	Synonyma	39
3.2	Wesen und Definition	39
3.3	Vorkommen	39
3.4	Ursachen, begünstigende Faktoren und Ätiologie	40
3.5	Entstehung, Pathogenese und Strukturveränderungen	40
3.6	Symptome und Komplikationen	41
3.7	Therapie	42
3.8	Prognose	43
3.9	Prophylaxe	43
4	<u>Das Biotin</u>	43
4.1	Geschichte	43
4.2	Chemie	44
4.3	Vorkommen, Bioverfügbarkeit und Bedarf	44
4.4	Metabolismus	45
4.5	Biochemie	45
4.5.1	<u>Funktion als prosthetische Gruppe</u>	45
4.5.2	<u>Coenzym unabhängige Funktionen</u>	47
4.6	Biotinmangel	48

4.7	Biotinsupplementierung	49
4.7.1	<u>Rind</u>	49
4.7.2	<u>Schwein</u>	50
4.7.3	<u>Pferd</u>	50
C	MATERIAL UND METHODEN	51
1	<u>Untersuchungsmaterial</u>	51
1.1	Tiere	51
1.2	Vorbereitungen durch die Schweizer Kollegen	51
1.3	Material	52
2	<u>Untersuchungsmethoden</u>	53
2.1	Lichtmikroskopie	53
2.1.1	<u>Herstellung und Färbung von Gefrierschnitten</u>	53
2.1.2	<u>Semidünnschnitte</u>	54
2.1.2.1	<i>Vorbereitende Tätigkeiten</i>	54
2.1.2.2	<i>Einbettung in Epon 812</i>	54
2.1.2.3	<i>Semidünnschneiden und Färben der Präparate</i>	55
2.1.3	<u>Paraffinschnitte</u>	55
2.1.3.1	<i>Probenaufbereitung</i>	55
2.1.3.2	<i>Einbettung in Paraffin</i>	55
2.1.3.3	<i>Herstellung von Paraffinschnitten</i>	55
2.1.3.4	<i>Histologische Übersichtsfärbungen</i>	56
2.1.3.4.1	Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	56
2.1.3.4.2	Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER	56
2.1.3.5	<i>Histochemische Nachweise</i>	56
2.1.3.5.1	Färbung mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach McMANUS	56
2.1.3.5.2	Bindegewebsfärbung nach LADEWIG	56
2.1.3.5.3	Pikrosiriusrotfärbung, modifiziert nach CONSTANTINE	56
2.1.3.5.4	Fibrinfärbung mit Martiusgelb-Scarlett-Blue	56
2.1.3.5.5	Keratinfärbung nach PAPANICOLAOU	57
2.1.3.5.6	Mitosendarstellung mit der Feulgen-Nuklear-Reaktion	57
2.1.4	<u>Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation</u>	57

2.2	Transmissionselektronenmikroskopie	57
2.2.1	<u>Probenvorbereitung</u>	57
2.2.2	<u>Durchführung der Ultradünnschnitt-Technik</u>	57
2.2.3	<u>Kontrastierung</u>	57
2.2.4	<u>Transmissionselektronenmikroskopische Auswertung und Dokumentation</u>	58
2.3	Extraktion und gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine der verhornten Epidermis	58
2.3.1	<u>Prinzip</u>	58
2.3.2	<u>Probenvorbereitung und Proteinextraktion</u>	59
2.3.3	<u>Herstellung homogener Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gele</u>	60
2.3.4	<u>Auftrennung und Darstellung der Proteine</u>	61
2.4	Statistische Methoden zur Beurteilung des Heilungserfolges unter Biotineinfluß	62
2.4.1	<u>Übertragung der Qualitätseigenschaften in statistisch nutzbare Zahlenwerte</u>	62
2.4.2	<u>Statistische Aufarbeitung der Werte mit SPSS Version 9.0</u> ..	64
D.	UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	65
1.	<u>Status am Tag 0</u>	65
1.1	Befunde in der Dermis	65
1.1.1	<u>Die Dermis im Wundzentrum am Tag 0</u>	65
1.1.2	<u>Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 0</u>	67
1.2	Befunde in der epidermalen Matrix	68
1.2.1	<u>Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 0</u>	68
1.2.2	<u>Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 0</u> ...	70
1.3	Befunde in der verhornten Epidermis	71
1.3.1	<u>Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 0</u>	71
1.3.2	<u>Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 0</u> ..	72
1.3.3	<u>Elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn am Tag 0</u>	73

2.	<u>Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 5</u>	74
2.1	Befunde in der Dermis am Tag 5	75
2.2	Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 5	75
2.3	Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 5	76
3.	<u>Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 10</u>	77
3.1	Befunde in der Dermis am Tag 10	77
3.2	Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 10	77
3.3	Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 10	78
4.	<u>Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 15</u>	79
4.1	Befunde in der Dermis am Tag 15	79
4.2	Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 15	79
4.3	Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 15	80
5	<u>Befunde am Tag 20</u>	80
5.1	Befunde in der Dermis	80
5.1.1	<u>Die Dermis im Wundzentrum am Tag 20</u>	80
5.1.2	<u>Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 20</u>	81
5.2	Befunde in der epidermalen Matrix	82
5.2.1	<u>Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 20</u>	82
5.2.2	<u>Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 20</u> ..	83
5.3	Befunde in der verhornten Epidermis	85
5.3.1	<u>Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 20</u>	85
5.3.2	<u>Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 20</u>	86
5.3.3	<u>Elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn am Tag 20</u>	87
6.	<u>Befunde an Tag 50</u>	88
6.1	Befunde in der Dermis	88
6.1.1	<u>Die Dermis im Wundzentrum am Tag 50</u>	88
6.1.2	<u>Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 50</u>	89
6.2	Befunde in der epidermalen Matrix	90
6.2.1	<u>Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 50</u>	90

6.2.2	<u>Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 50 . .</u>	92
6.3	Befunde in der verhornten Epidermis	96
6.3.1	<u>Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 50</u>	96
6.3.2	<u>Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 50</u>	96
6.3.3	<u>Elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn am Tag 50</u>	97
7.	<u>Biotinbedingte strukturelle Unterschiede im Ablauf der Wundheilung</u>	98
8.	<u>Statistik: Entwicklung der histologischen Qualität im Verlauf der Wundheilung unter Biotineinfluß</u>	99
E.	DISKUSSION	105
1.	<u>Methodik</u>	106
2.	<u>Mikrozirkulation und Integrität des dermalen Bindegewebes</u>	108
3.	<u>Veränderungen am dermoepidermalen Grenzbereich . .</u>	111
4.	<u>Intrazelluläre strukturelle Veränderungen in der Epidermis</u>	112
4.1	Epidermale Matrix	112
4.2	Stratum corneum: Zellproteine und marginales Band . .	121
5.	<u>Veränderungen der epidermalen Interzellularspalten . .</u>	122
6.	<u>Unterschiede zur Wundheilung in der äußeren Haut . . .</u>	126
7.	<u>Wirkung einer Biotinsupplementation auf den Heilungsverlauf</u>	129
F.	ZUSAMMENFASSUNG	131
G.	SUMMARY	133
H.	ABBILDUNGEN	135
I.	SCHRIFTTUM	169

ABKÜRZUNGEN IM TEXTTEIL

µm, µl, µg	Mikrometer, -liter, -gramm	min	Minute(n)
A	Ampère	mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
Abb.	Abbildung	MSB	Martiusgelb-Scarlett-Blue
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase	N	Anzahl Versuchstiere
AE 1/3	Antizytokeratin	nm	Nanometer
AGJ	annular gap junction, Nexus	OsO4	Osmiumtetroxid
AK	Antikörper	PAG	Polyacryl-Amid-Gel
AMP	Adenosin-Monophosphat	PAS-	Periodic-Acid-SCHIFF-(reaktion)
Aqua dest.	destilliertes Wasser	PC	Pyruvat-Carboxylase
ATP	Adenosin-Triphosphat	PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase
cGMP	zyklisches Guanin-Monophosphat	pH	Potentio Hydrogenii
CK	Zytokeratin	pl	isoelektrischer Punkt
cm	Zentimeter	QF	Qualitätsfaktor
CoA	Coenzym A	rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
D	Dermis	RNA	Ribonukleinsäure, engl. Ribonucleic Acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. Desoxyribonucleic Acid	Sc	Stratum corneum
DTT	Dithiothreitol	SDS	Natrium Dodecylsulfat, engl. Sodium Dodecyl Sulfat
E	lebende epidermale Matrix	SH-	Sulfhydryl-, Schwefelhydroxid
Fa.	Firma	Ss	Stratum spinosum
G1 usw.	Geschwürprobe Nr. 1 usw.	ST0 usw.	Summe der Einzelnoten vom Tag 0 usw.
GMP	Guanin-Monophosphat	T0 usw.	Tag 0 usw.
gr.	griechisch	TEM	Transmissionselektronen- -mikroskop(ie)
H	verhornte Epidermis, Horn	TEMED	Tetramethylethylen- diamin
IFAP	Intermediärfilament- assoziierte Proteine	Tris	Trishydroxyethyl- Aminomethan-HCl
K1	Referenzprobe Nr. 1	U/min.	Umdrehungen pro Minute
Kap.	Kapitel	V	Volt
kd	Kilodalton	W	Watt
LM	Lichtmikroskop(ie)	w/w	wässrig in Wasser
LMW	Low Molecular Weight	WL	weiße Linie
M	Maximalwert		
m	Minimalwert bzw. Milli-		
MCC	Methylcrotonyl-CoA- Carboxylase		
MCG	membrane coating granule		
MCM	membrane coating material, Interzellularkitt		
MG	Molekulargewicht		

DANKSAGUNG

Meinem Lehrer und Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K.-D. Budras, danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation, seine wissenschaftliche Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Dr. Ch. Mülling danke ich für die Betreuung, seine Unterstützung, seinen fachlichen und menschlichen Rat.

Der Firma Hoffmann-LaRoche danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr. Ch. Lischer und seinen Kollegen danke ich für die Probenentnahme.

Frau M. Sachtleben und Frau Ch. Schiel danke ich für die Unterrichtung und Hilfe in den transmissionselektronenmikroskopischen Techniken und für Fotoarbeiten.

Frau M. Schaerig und Frau I. Küster-Krehan danke ich für die Hilfe und zahlreichen praktischen Tipps bei der Probenbearbeitung für die Lichtmikroskopie.

Frau K. Hindorf und Frau G. Schröer danke ich für Fotoarbeiten.

Herrn Dr. S. Reese danke ich für die Bearbeitung der ersten TEM-Proben.

Herrn Prof. Dr. E. Reinwald und Frau B. Alex danke ich für Einblicke in die gradientengelelektrophoretischen Techniken und praktischen Tipps für die SDS-PAG-Elektrophorese.

Frau Dr. G. Arndt danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Datenverarbeitung.

Mitgliedern und Sympathisanten der Arbeitsgemeinschaft "Zehenendorgan" danke ich für ermutigende Gespräche, anregende Diskussionen, praktische Tipps und immerwährende Hilfe bei Computerproblemen.

Dr. C.-H. Lammers danke ich für die Beschaffung wichtiger Literaturquellen aus den USA.

K.-H. Patzwaldt danke ich für das Korrekturlesen von Teilen des Manuskriptes.

Herrn Dr. P. Ossent danke ich für die Durchsicht des Abbildungsteiles.

Janet Lissan danke ich für die Übersetzung der Zusammenfassung.

Tom, danke, dass es Dich gibt.

LEBENS LAUF

- Name: Tina Eggers
Geburtsdatum: 30.01.1967
Geburtsort: Itzehoe
Eltern: Dr. med. Boie Eggers
Renate Eggers, geb. Jepsen
- 1973 – 1977: Besuch der Wolfgang-Ratke-Grundschule in Wilster
1977 – 1986: Besuch der Kaiser-Karl-Schule in Itzehoe
28.05.1986: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
- 1987 – 1989: Ausbildung zur veterinärmedizinisch-technischen Assistentin an der Lehranstalt für VMTA in Oberschleißheim bei München mit Abschluss
- 1998 – 1990: Beschäftigung am Institut für Tiergesundheit und Lebensmittelqualität der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein in Kiel
- 1990 – 1996: Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin mit Abschluss Staatsexamen
- 1993 – 1994: Studienjahr an der Ecole Nationale Vétérinaire in Alfort bei Paris, Frankreich, im Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes
- 07.10.1996: Approbation als Tierärztin
- seit 18.11.1996: Doktorandin am Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin
- WS 1997/1998: Lehrauftrag für die Präparierübungen I, Anatomie des Hundes am Institut für Veterinär-Anatomie
- WS 1998/1999: Lehrauftrag für die Präparierübungen II, Anatomie der Huftiere am Institut für Veterinär-Anatomie
- WS 1999/2000: Lehrauftrag für die Präparierübungen II, Anatomie der Huftiere am Institut für Veterinär-Anatomie
- WS 2000/2001: Lehrauftrag für die Präparierübungen I, Anatomie des Hundes am Institut für Veterinär-Anatomie
- 07.1999 – 06.2000: NaFöG-Stipendiantin

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium nach dem Gesetz zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses (NaFöG) des Landes Berlin gefördert.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegenden Arbeiten, Untersuchungen und die Erstellung der Dissertationsschrift unter Zuhilfenahme der angegebenen Literaturstellen und Hilfsmittel selbständig durchgeführt habe.

Tina Eggers