

D. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Zur Auswertung und Beschreibung der Befunde wurden die Präparate so orientiert, dass die Lederhaut nach unten weist und die Epidermis (epi-, gr. = auf, darauf, zu, über) über der Dermis liegt. So ist die Zellvorschubs- und Differenzierungsrichtung in der Epidermis von unten nach oben. Die Abbildungen sind nach Möglichkeit entsprechend orientiert. Dies stimmt allerdings nicht der proximodistalen Differenzierungsrichtung an der Grundfläche der Klaue überein, die am stehenden Tier von oben nach unten verläuft.

Die Beschreibung der Dermis folgt deren Unterteilung in das Stratum reticulare und das Stratum papillare, wobei bei den Papillen ein basaler und apikaler Abschnitt unterschieden werden. Die Basalmembran wird im Zusammenhang mit der Dermis abgehandelt, obwohl sie mit ihrer Basallamina ein Syntheseprodukt der Epidermis ist. Von den epidermalen Zellschichten wird zunächst das Stratum basale berücksichtigt, in dem die Basalzellen in den interpapillären epidermalen Vertiefungen von den peripapillär und suprapapillär liegenden Basalzellen abzugrenzen sind. Dann werden das untere, evtl. mittlere und obere Stratum spinosum und das Stratum granulosum beschrieben. Darauf folgen die Beschreibung der tiefen, intermediären und oberflächlichen Hornschichten (Abb. 1b). Die Beschreibungen sollen sich auf die Befunde beschränken, die von der gesunden normalen Struktur abweichen.

1. Status am Tag 0

1.1 Befunde in der Dermis

1.1.1 Die Dermis im Wundzentrum am Tag 0

Das Wundzentrum der RUSTERHOLZschen Klauengeschwüre (Abb. 1a) ist der chirurgisch bis in die Dermis trichterförmig ausgeschnittene Bereich, in dem die Fläche der freigelegten Lederhaut in jedem Fall auf eine Standardgröße von 4 cm² erweitert wurde und die offene Wundmulde mit Bestandteilen des Blutes aus den verletzten Blutgefäßen der Dermis angefüllt ist. Histologisch sind hier aggregierte Thrombozyten, Fibrinfäden, eingeschlossene Erythrozyten, vereinzelt Granulozyten und andere Entzündungszellen wie Lymphozyten zu differenzieren (Abb. 3a).

Etwa ein Viertel der Proben vom Tag 0 wird aufgrund der schweren strukturellen Abweichungen von der Norm dem Wundzentrum zugeordnet.

Das Stratum papillare der Dermis der Klauengeschwüre zeigt basal leicht geöffnete bis stark dilatierte und thrombosierte Blutgefäße (Abb. 2b und 2d). Stellenweise sind Lederhautpapillen von den sie umschließenden Epidermisröhrchen abgelöst und von Blutbestandteilen umgeben (Abb. 2c und 2d) oder gar vollständig aus den Epidermisröhrchen herausgelöst und im histologischen Präparat nicht mehr vorhanden. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Vergrößerung sind innen an der Gefäßwand vereinzelt anhaftende Erythrozyten erkennbar, wobei die Endothelzellen Zellfortsätze an die Erythrozytenoberfläche senden (Abb. 4b). In vielen Endothelzellkernen ist eine leichte Kernwandhyperchromasie (gesteigerte Anfärbbarkeit des randständigen Chromatins) zu verzeichnen. In den apikalen Papillenabschnitten einzelner Proben sind aus den verletzten Gefäßen Blutbestandteile in die Umgebung ausgetreten und haben sich im dermalen Bindegewebe zwischen den Kollagenfasern angesammelt (Abb. 2c). Die Bindegewebsfasern sind an den Papillenbasen leicht, an den Spitzen stärker gequollen. Transmissionselektronenmikroskopisch konnten einzelne Bindegewebszellen als Fibroblasten identifiziert werden, da sie neben einem großen zentral gelegenen Zellkern mit einem bis mehreren Nukleoli ein umfangreiches rauhes endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Felder und zahlreiche Mitochondrien besitzen. Einige Fibroblasten zeigen auch gefurchte Zellkerne, andere zeigen Degenerationserscheinungen wie leichte Zellkernwandhyperchromasie oder erweiterte perinukleäre Spalten und geblähte Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums (Abb. 4d). Im Stratum papillare der Dermis befinden sich auch vereinzelt Granulozyten und Lymphozyten (Abb. 4c).

Die elektronendichte Basallamina (Lamina densa) weist stellenweise beulenartige Schwellungen sowie Verdoppelungen auf (Abb. 4e). In der Wundmulde verliert sie sich. Die Dichte an Hemidesmosomen ist abschnittsweise sehr hoch.

In den beiden vom Tag 0 vorhandenen (dreieckigen) Proben des RUSTERHOLZschen Klauengeschwüres des Tieres Nr. 28 sind die Blutgefäße im Stratum papillare der Dermis leicht dilatiert und leer (Abb. 4a). Vereinzelt zytoplasmaüberzogene runde bis ovale Endothelzellkerne ragen mit einem Kernpol in das Gefäßlumen. Ein Teil der Blutgefäße ist nur mit Thrombozyten verstopft (weißer Thrombus). Andere sind zusätzlich mit Fibrinfäden, Erythrozyten und Entzündungszellen gefüllt (gemischter Thrombus). Zum Teil sind Erythrozyten, Thrombozyten und auch Granulozyten aus den Blutgefäßen ausgetreten und bilden Aggregate im Bindegewebe. In einigen Papil-

len ist das Bindegewebe leicht gequollen, besonders in der Region der Papillenspitze. Es stellt sich lichtmikroskopisch homogen und glatt dar. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Vergrößerung ist erkennbar, dass die Bindegewebsfasern geordnet und locker in den Papillen liegen. Die Fibrozyten in der Dermis sind reich an rauhem endoplasmatischem Retikulum. Einige Bindegewebszellen besitzen in unmittelbarer Kernnähe blasenförmige vakuoläre Auftreibungen, die den Zellkern eindrücken. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchung stellen sich diese Auftreibungen als geweitete perinukleäre Spalten dar, die mit sehr lockerem, feinflockigem Material ausgefüllt sind (Abb. 4d).

An der dermoepidermalen Grenze fehlt stellenweise die Lamina rara externa zwischen der Zellmembran der Basalzellen und der Lamina densa (Abb. 4f). Die elektronendichte Lamina densa ist durchgehend ausgebildet. Sie variiert stellenweise jedoch in ihrer Dicke und Elektronendichte. Verdoppelungen und Schleifenbildungen der Lamina densa treten auf (Abb. 4e). Zahlreiche Hemidesmosomen zwischen der Zellmembran der Basalzellen und der Basallamina (Lamina densa) verankern diese beiden Strukturen miteinander.

1.1.2 Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 0

Drei Viertel der Proben vom Tag 0 zeigen nur geringe strukturelle Abweichungen von der Norm. Sie sind vermutlich den Bereichen entnommen, die dem Wundzentrum angrenzen.

Im Stratum reticulare der Dermis kommen Blutgefäße mit dicker Blutgefäßwand, Arteriolen, ebenso vor wie dünnwandige Exemplare, Venulen, deren Lumen meist bis auf einen schmalen Schlitz verschlossen ist. Letztere Gefäße weisen im Querschnitt meist zahlreiche in das Lumen hineinragende Endothelzellkerne auf. Kollagenfasern und zahlreiche Bindegewebszellen liegen locker bis kompakt in der Umgebung von Blutgefäßen (Abb. 2a). Die Fibroblasten enthalten zum Teil massenhaft Mitochondrien und vesikuläre Einschlüsse, die lichtmikroskopisch als Fetttropfen identifiziert wurden (Abb. 2a).

Im basalen Teil des Stratum papillare ist die Dichte der Endothelzellkerne sehr hoch. Vereinzelt sind Erythrozyten im sehr engen Gefäßlumen eingeklemmt oder sie sind in das Bindegewebe und weiter in das Stratum basale der Epidermis ausgetreten

(Abb. 2c). Englumige Blutgefäße sind stellenweise thrombosiert. Apikal in den Papillen sind die Blutgefäße meist kollabiert, teils dilatiert und leer, teils thrombosiert. Auch hier ist der Austritt von Blutbestandteilen in das umgebende Bindegewebe oft zu sehen. Die Zellpopulation in der Dermis weist zahlreiche polymorphkernige Granulozyten auf (Abb. 4c). Diese befinden sich sowohl in den Blutgefäßen als auch im Bindegewebe.

Die Lamina rara externa und Lamina densa der Basalmembran in der Wundperipherie erscheint in einigen Präparaten wie im Wundzentrum (Abb. 4f). Die Dicke der veränderten Basallamina schwankt außerdem und ebenso variiert die Zahl der Hemidesmosomen sowohl bei den verschiedenen Tieren als auch innerhalb derselben Probe.

1.2 Befunde in der epidermalen Matrix

Die epidermale Matrix umfaßt alle lebenden Epidermisabschnitte, und zwar das Stratum basale, Stratum spinosum und, sofern vorhanden, das Stratum granulosum.

1.2.1 Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 0

In den Basalzellen sind lokal hypertrophierte Golgi-Vakuolen, Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums und einzelne Mitochondrien anzutreffen. Die Zellkerne sind heterochromatisch (Abb. 5c). Zwischen den Zellen des Stratum basale ist ein extrem geweiteter heller Interzellularspalt auffällig (Abb. 5a). Hier liegen massenhaft lange, dünne Fortsätze benachbarter Basalzellen von Exsudat umgeben (Abb. 5b). In anderen Interzellularspalten, wo die Epidermiszellen weit auseinander liegen, sind weiße Blutzellen wie Granulozyten und Lymphozyten eingedrungen (Abb. 5d).

Einige Zellen im unteren Stratum spinosum lassen transmissionselektronenmikroskopisch besonders deutlich große, blasenförmige Zytoplasmainschlüsse erkennen, die mit lockerem, feinflockigem Material angefüllt sind. Auch Mitosefiguren sind in der unteren Lage des Stratum spinosum, besonders in den epidermalen Vertiefungen zwischen den Papillen, sichtbar (Abb. 2e). Manche Spinosazellen haben in ihrem Zentrum einen stark gefurchten Zellkern. Im mittleren Stratum spinosum ist eine Zellmembran selbst transmissionselektronenmikroskopisch zwischen Interzellularspalt und Zytoplasma nicht (mehr) nachweisbar. Der Keratinfilamentgehalt ist in manchen Epidermiszellen des Stratum spinosum reduziert. Der dem Wundrand benachbarte epidermale Zellverband weist dyskeratotische Veränderungen in den Spi-

nosazellen auf. Unter der Verhornungsgrenze sind die Zellen bei ungeordneter Orientierung struktur- und filamentarm.

Das untere Stratum spinosum wird ebenfalls von teilweise sehr weiten, hellen Interzellularspalten durchzogen. In oberen Schichten füllt sich der Interzellularspalt zwischen den Spinosazellen mehr und mehr mit Interzellularkitt, der zunehmend die gleiche Färbintensität wie das Zytoplasma aufweist. Der mit Interzellularkitt gefüllte Interzellularspalt stellt sich im oberen Stratum spinosum lichtmikroskopisch bei der Färbung nach *RICHARDSON (1960)* als dunkles Band dar.

Die Verhornungsgrenze ist abrupt und durch die in das Stratum corneum hineinragenden Papillenspitzen zackenförmig (Abb. 3e). Einige Zellen kornifizieren verzögert bei fehlender Synchronisation in der Verhornung.

In den beiden vom Tag 0 vorhandenen Proben des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs vom Tier Nr. 28 enthalten die Spinosazellen im filamentfreien perinukleären Saum membrane coating granules. Stellenweise sind einzelne Spinosazellen bis auf die Zellmembran und Keratinfilamente aufgelöst (Abb. 3c), andere enthalten dunkle, dichte, kleine, runde bis ovale Melaningranula und Vesikel mit Substanzen unterschiedlicher Elektronendichte. In den oberen Schichten degenerieren die Zellkerne zunehmend durch Verblässen und Karyolysis.

Die Interzellularspalten zwischen den Basal- und unteren Spinosazellen sind stark geweitet, sehr locker mit feinkörnigem Material und teilweise mit noch intakten Vesikeln feinkörnigen Inhaltes angefüllt, die vielfach Kontakt zur benachbarten Spinosazelle aufnehmen. Dieser Inhalt im Interzellularspalt wird von einer einschichtigen Membran umschlossen (Abb. 5e). Desmosomen an langen Zellausläufern gegenüberliegender Zellen sorgen für eine Verknüpfung der Zellen miteinander (Abb. 5a). Lange intrazelluläre Keratinfilamentbündel verlaufen im spitzen Winkel gestreckt zu den Desmosomen, die nicht an der Spitze der Fortsätze, sondern seitlich liegen. Im oberen Stratum spinosum sind die Interzellularspalten mit dichtem Interzellularkitt vollständig gefüllt. Zwischen den Spinosazellen liegen vereinzelt Granulozyten mit einem gefurchten bis nierenförmigen Zellkern in peripherer Lage, vereinzelt Granula, Mitochondrien und einem hellen, feinkörnigen Zytoplasma. Sie füllen den Spalt zwischen den Spinosazellen vollständig aus (Abb. 5d). Weiterhin kommen Lymphozyten und Plasmazellen vor.

Eine abrupte Verhornungsgrenze ist häufig deutlich und linear, jedoch sind einzelne Zellen bereits unterhalb der Verhornungsgrenze vorzeitig vor den benachbarten Zellen verhornt (Abb. 5f). Eine ausgeprägte Retention von feinkörnig gefüllten Vesikeln, die große Ausmaße erreichen, führt zum Teil zur Kompression von Zellkernabschnitten (Abb. 5g).

1.2.2 Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 0

Auch in der Wundperipherie sind die Zellkerne der Basalzellen überwiegend heterochromatisch. Lichtmikroskopisch auffallende schmale, blasige Säume aus vakuolär degenerierten Organellen kommen ebenfalls perinukleär vor. Diese sind Äquivalente der transmissionselektronenmikroskopisch vakuolär degenerierten Mitochondrien. Die oberen peripapillären und suprapapillären Basalzellen zeigen partiell ein vollkommen löchriges oder blasses und strukturloses Aussehen. Besonders Mitochondrien bzw. deren Degenerationsstadien in Form leerer äußerer Membranreste nehmen im perinukleären Bereich immer mehr zu, je weiter die Basalzellen suprapapillär an der Papillenspitze liegen. Mitosefiguren sind in unteren Epidermislagen in den interpapillären Vertiefungen anzutreffen (Abb. 2e).

Die Interzellularspalten des Stratum basale sind sehr weit. In ihnen sind sehr lange schlanke Basalzellfortsätze transmissionselektronenmikroskopisch nachweisbar, die die interzellulären Verbindungen gewährleisten. Trotz der Vielzahl an Zellfortsätzen bleibt ungefähr die Hälfte des Interzellularspaltes fortsatzfrei und optisch leer. Zwischen den peripapillären Basalzellen an der Spitze der Lederhautpapillen nimmt die Weite des Interzellularspaltes zu. Einige Entzündungszellen, insbesondere Granulozyten und kleine Lymphozyten, haben sich zwischen die Basalzellen geschoben und erweitern hier den Interzellularspalt. Die mit Melaningranula gefüllten Zellfortsätze der Melanozyten dringen bis in untere Bereiche des Stratum spinosum vor und liegen dort ebenfalls in den Interzellularspalten.

Ein breiter, blasiger perinukleärer Saum um den Zellkern ist neben den Basalzellen auch in den Spinosazellen häufig anzutreffen. Dieser besteht ebenfalls aus Mitochondrienresten, von denen nur noch die äußere Membran intakt ist und die inneren Cristaemembranen aufgelöst sind. Das Chromatin der Zellkerne wird zunehmend euchromatisch. In höheren Lagen besteht das Zellzentrum nach totaler Karyolysis meist aus einem optisch leeren Bereich. In manchen Arealen des Stratum spinosum

ist in den Zellen zwischen den Keratinfilamenten nur sehr wenig Zytoplasma enthalten (Abb. 3c). In der Nähe von Papillenspitzen, in denen die Blutgefäße überwiegend mit Erythrozyten und einzelnen Granulozyten thrombosiert sind, sammelt sich vermehrt Flüssigkeit zwischen den Keratinfilamenten der Epidermiszellen an (Abb. 3b). Mitosen treten auch in den unteren Spinosazellen bevorzugt im Bereich der interpapillären epidermalen Vertiefungen auf (Abb. 2f).

Zwischen den unteren Spinosazellen finden sich zunächst noch über einige Lagen weite Interzellularspalten, die teils durch Zellfortsätze angefüllt sind. Einzelne Kittvesikel sind im Interzellularspalt des mittleren Stratum spinosum sichtbar.

Obwohl die Proben vom Tag 0 (Probe 1) der dem Weichballen zugewandten Geschwürseite entnommen wurden (s. Textabbildung 1, Kap. C.1.3), treten einzelne Zellen mit Keratohyalin granula, die eine Benennung des epidermalen Bereiches als Stratum granulosum rechtfertigen, lediglich in den suprapapillären Epidermiszellen im Bereich der Papillenspitze auf. In einer Probe (Tier 21, Geschwür 1) konnte hingegen ein deutlich verdicktes, 30 bis 40 Zelllagen umfassendes Stratum granulosum gefunden werden (Abb. 3d).

An der Verhornungsgrenze flachen die Zellen zwischen dem oberen Stratum spinosum bzw. granulosum und dem unteren Stratum corneum meist abrupt ab. Unvermittelt und gleichzeitig erfolgt meist auch die Keratinfilamentaggregation zu einer homogenen bis leicht marmorierten Zellmasse und damit steigt die Färbeintensität im lichtmikroskopischen Präparat. Ein marmoriertes Aussehen erhalten die Zellen durch Unterschiede in der Elektronendichte der Keratinfilamente und der Keratinfilament-assoziierten Proteine, wenn sich diese Bestandteile voneinander abgrenzen und der filamentäre Aufbau des Zytoskelettes nach der Verhornung erkennbar bleibt.

1.3 Befunde in der verhornten Epidermis

1.3.1 Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 0

Selbst oberhalb schwerer Keratinisierungsstörungen im oberen Stratum spinosum bzw. Stratum granulosum entsprechen die tiefen Hornzellen in den meisten Geschwürproben dem gesunden Bild eines nahezu intakten Stratum corneum (Abb. 6a). Die Störung durch das Geschwür geht von den tieferen Gewebeschichten aus. Die Synchronisation der Verhornung ist allerdings auch hier gestört, so dass zwischen verhornten Zellen immer wieder unverhornte und zwischen noch unverhornten schon

überstürzt verhornte Zellen liegen. Der Zellinhalt ist kompakt und leicht marmoriert, das heißt unterschiedlich elektronendichte Bestandteile der Hornmassen liegen in der Zelle nebeneinander und geben ein marmorartiges Muster. Er füllt die gesamte Zelle aus, die im Bereich der Verhornungsgrenze von einer Zellschicht zur nächsten abflacht, spindelförmig wird und sich senkrecht zur Zellvorschubsrichtung orientiert (Abb. 6c). Stellenweise sind die Hornzellen der ersten tiefen Lagen noch irregulär orientiert und vorzeitig zerfallen und bieten ein wabig-spongiöses Aussehen im Transmissionselektronenmikroskop (Abb. 6f). Der Inhalt anderer Hornzellen ist stark verändert. Nur noch verformte, eingedellte Kernreste sind erkennbar.

Umgeben sind diese Hornzellen von geweiteten Interzellularspalten, die im Zentrum mit homogenem Interzellularkitt gefüllt sind, der jedoch zur Hornzelloberfläche schmale optisch leere Spalten frei lässt (Abb. 6f). Die Interzellularspalten zwischen den Hornzellen sind meist gleichmäßig eng und blasenförmige Erweiterungen der Interzellularspalten sind nahezu vollständig mit einem homogenen elektronendichten Interzellularkitt ausgefüllt (Abb. 6d). Vom Wundkrater aus dringt Blutflüssigkeit in angrenzende eröffnete Interzellularspalten (Abb. 6b). An den Zellflanken verlaufen die Spalten mäanderförmig gewunden, was die Zellen stark miteinander verzahnt, eine größere Oberfläche schafft und einen festen Zellzusammenhalt gewährleistet. An der Zellober- und -unterseite ist der Verlauf meist nur leicht wellenförmig. Spalten, Risse und Löcher sind selten, aber Desmosomenreste sind zahlreich.

Das Stratum corneum der Proben aus dem Wundzentrum ist nur dünn und meist mit flüssigen und korpuskulären Blutbestandteilen bedeckt, die sich mit zerfallenem Horn vermengen (Abb. 3f). Aufgrund seiner flachen Ausprägung ist eine Unterscheidung von Zwischenröhrchenhorn- und Röhrchenhornzellen im Stratum corneum nicht möglich.

1.3.2 Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 0

Die Hornzellen entsprechen auch in der Wundperipherie in den meisten Geschwürproben annähernd dem gesunden Bild, allerdings liegen auch hier oberflächenwärts der Verhornungsgrenze immer wieder unverhornte oder dyskeratotische Zellen (Abb. 6e). Der kompakte Zellinhalt ist homogen bis leicht marmoriert durch abgrenzbar bleibende Keratinfilamente. Er füllt die gesamte Zelle aus. Im Bereich der Verhornungsgrenze flachen die Zellen von einer Zellschicht zur nächsten ab, werden in

Textabbildung 3: Bandenstruktur am Beispiel der Proteinextrakte von Tier 8, die für den Tag 0 repräsentativ ist



Wanderungsrichtung der Proteine

Die Bande von 43 kd Zellproteinen (* in der Textabbildung 3 ganz links) ist in allen untersuchten Geschwür- und Referenzproben auf einem 10%igen homogenen SDS-PAGE Gel konstant und etwa einen Millimeter breit. Die darauf folgende Bande (* in der Textabbildung 3 der zweite Stern) ist sehr kräftig und breit. Berechnungen der Molekulargewichte der hier konzentrierten Proteine ergaben fusionierende Banden der Proteine mit 45 bis 50 kd. Die einzelnen Banden sind nicht voneinander zu trennen. Die 54 kd Proteine (* in der Textabbildung 3 der dritte Stern) sind nur bei den Proben mit hohem Ausgangsproteingehalt deutlich von der dicht darauf folgenden 56 bis 58 kd-Bande abzugrenzen. Bei den Proben mit wenig Gesamtproteingehalt stellt sich diese dünne Bande nur sehr undeutlich dar und verschmilzt mit der folgenden. Die 56 bis 58 kd-Bande (* in der Textabbildung 3 der vierte Stern) ist wieder bei allen Proben etwa 1 bis 1,5 mm breit. Zellproteine mit 63 kd bilden eine feine Bande (* in der Textabbildung 3 der fünfte Stern), die auch hier wieder je nach Gesamtproteingehalt deutlicher oder schwächer ausgeprägt ist. Eine ebenso feine Bande vereint die Proteine von 67 kd (* in der Textabbildung 3 der sechste Stern). Die Proteine von 69 kd (* in der Textabbildung 3 der letzte Stern) stellen in dieser Auftrennung die schwächste Gruppe der Hornzellproteine dar. Damit ist das Repertoire der Zellproteine im Gewichtsbereich von Zytokeratinen erschöpft und alle weiteren dargestellten Proteine (> 93 kd) sind schwere Nicht-Keratin-Proteine.

Die Referenzproben (K1) dienen als Grundlage für „gesundes“ Horn. Sie wurden am Tag 0 aus der kontralateralen gesunden Außenklaue jedes Tieres entnommen.

Insgesamt ist das Bild der Banden bei allen untersuchten Proben bis auf geringe graduelle Unterschiede einheitlich.

2. Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 5

Die folgenden Befunde stammen aus der Untersuchung der Proben des einzigen Tieres Nr. 28, von dem Proben aus einem heilenden RUSTERHOLZschen Klauengeschwür von den Tagen 5, 10 und 15 zur Verfügung stehen. Sie sind damit nicht allgemeingültig, sondern nur exemplarisch für die Zustände in der Dermis und der Epidermis am 5., 10.

und 15. Tag der Wundheilung. Aufgrund der sehr kurzen Intervalle bei der Probenentnahme im Abstand von 5 Tagen entstanden technische Grenzen, weil erstens in der Zwischenzeit nicht immer ausreichend Leder- und Oberhaut nachgebildet wurde und zweitens die Probenentnahme gleichzeitig so wenig invasiv wie möglich erfolgen sollte. Folglich sind die entnommenen Proben mehr oder weniger unvollständig. Mit der Probenentnahme in fünftägigen Abständen sollte ermöglicht werden, ein fortlaufendes Heilungsgeschehen zu verfolgen.

2.1 Befunde in der Dermis am Tag 5

In den Proben vom RUSTERHOLZschen Klauengeschwür an der Außenklaue der linken Hintergliedmaße am Tag 5 sind dermale Anteile nicht vorhanden, weil bei der Entnahme von Proben aus dem Geschwür versucht wurde, die Lederhaut, besonders die tieferen Anteile, soweit wie möglich zu schonen.

2.2 Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 5

Von der epidermalen Matrix der beiden Proben am Tag 5 der Wundheilung des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs sind lediglich Anteile des Stratum granulosum vorhanden. Wenige Zellen unter der Verhornungsgrenze enthalten Keratohyalingranula. Die Granula liegen in Kernnähe und dellen den Zellkern an dieser Stelle ein (Abb. 7d). Neben den Keratohyalingranula enthalten die Zellen auch Keratinfilamente in Bündeln und intrazelluläre vakuoläre Einschlüsse wie auch Kittvesikel. Die Zellkerne dieser Zellen sind vielfach karyolytisch degeneriert. Die noch degenerierenden Zellkerne sind abgeflacht und verblasst, bevor auch sie karyolytisch werden. Die Membranen benachbarter Zellen sind an zahlreichen Stellen durch Desmosomen verknüpft, die im Vergleich zur Norm vermindert sind. In den interdesmosomalen Bereichen sind die Interzellularspalten leicht geweitet und meist vollständig, aber mit elektronenoptisch locker erscheinendem, granuliertem Interzellularkitt gefüllt, denn die feinen Granula liegen in den Interzellularspalten gleichmäßig verstreut. Bereichsweise finden sich schmale membranumschlossene Zellfortsätze benachbarter Zellen in den Interzellularspalten (Abb. 7c) und füllen diese Interzellularspalten nur zum Teil aus. Der andere Teil wird von Interzellularkitt eingenommen, der die gleiche Dichte und

ähnliche Struktur wie das Zytoplasma in den Zellfortsätzen hat. In manchen Spalten weist der Interzellularkitt verschiedene Elektronendichten auf.

2.3 Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 5

Die tiefen Zellschichten des Stratum corneum bieten bei den Proben des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs vom Tier Nr. 28 am Tag 5 das Bild einer annähernd "normalen" Hornstruktur. Das Zwischenröhrchenhorn besteht aus nahezu homogenen, lichtmikroskopisch basophilen und transmissionselektronenmikroskopisch leicht marmorierten Zellen, die bereichsweise durch sichtbar bleibende Keratinfilamente, Lipidtröpfchen, partielle Zellkernreste und vakuoläre Einschlüsse mit feinschaumigem Material gekennzeichnet sind (Abb. 7f). Die Formenvielfalt der Zellen im tiefen Stratum corneum reicht von spindelförmig bis polygonal. Die spindelförmigen Zellen sind mit ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche orientiert.

Die Interzellularspalten sind in den interdesmosomalen Bereichen geweitet und fast vollständig mit Interzellularkitt gefüllt, der teils eher locker erscheint, teils elektronendichter ist (Abb. 7e). Zwischen den Hornzelloberflächen und dem kompakten Interzellularkitt bleiben stellenweise leere Spalten (Mikrorisse), die für einen gestörten Zusammenhalt zwischen Interzellularkitt und Zelloberfläche sprechen. Aus einigen erweiterten Interzellularspalten ist der Kitt teilweise bis vollständig herausgelöst. Der allmähliche Zerfall der Hornzellmassen setzt nach Durchlaufen einer schmalen intakten Hornschicht ein, in der die Interzellularspalten nicht mehr so stark geweitet sind. Im Bereich des zerfallenen Hornes sind auch Erythrozytenaggregate in spindelförmigen Spalten eingeschlossen (Abb. 7b). In dem zum Wundzentrum gelegenen trichterförmigen Bereich biegt die Unterkante des Stratum corneum dermiswärts ab und zeigt hier und in der Fortsetzung des Stratum corneum zur Oberfläche einen homogen basophilen Interzellularkitt, der die Interzellularspalten ausfüllt (Abb. 7a).

Das Röhrchenhorn erscheint im tiefen Anfangsteil des Stratum corneum sehr locker, ist aber nahezu homogen. In den Interzellularspalten des Röhrchenhornes sammelt sich der homogene Interzellularkitt zu umfangreichen Massen an. Dazwischen findet sich filamentöses bis feingranuläres Material von abgebauten Hornzellorganellen. Der

homogene Interzellularkitt nimmt auf Kosten des feingranulären Materiales oberflächenwärts immer mehr zu. Außerdem verdichtet er sich zunehmend.

3. Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 10

3.1 Befunde in der Dermis am Tag 10

In den Proben des Tieres Nr. 28 aus dem RUSTERHOLZschen Klauengeschwür vom Tag 10 sind keine dermalen Anteile enthalten.

3.2 Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 10

Suprapapilläre und obere peripapilläre Basalzellen und angrenzende Spinosazellen weisen perinukleär häufig einen Saum aus Mitochondrien auf, deren Cristaemembranen verlorengegangen sind. Diese Mitochondrienreste liegen dicht beieinander und stellen nur noch leere äußere Hüllen dar (Abb. 8b). Sie setzen sich bis in das Stratum granulosum fort, in dem sich zusätzlich zahlreiche Keratohyalingranula hinzugesellen. Zwischen den basalen Keratinozyten sind immer wieder andere Zellen wie Granulozyten oder Melanozyten eingefügt.

Die Zellen des Stratum spinosum sind stellenweise groß und mit ihrer Längsachse meistens parallel zur Verhornungsgrenze ausgerichtet. An anderen Stellen sind ganze Bereiche von Zellen geschrumpft (Abb. 8a). Der meist hyperchromatisch degenerierte Zellkern liegt im Zellzentrum und ist von einem hellen, teils homogenen, teils spongiösen Zytoplasma umgeben. Das übrige Zytoplasma in einigen Spinosazellen erscheint durch solitäre Keratinfilamente feinfädig. Stellenweise ist die Zellmembran der Zellen zerstört und nur noch im Bereich der desmosomalen Kontakte erhalten, die außerdem vermindert sind.

Die Interzellularspalten sind leicht, bereichsweise zunehmend geweitet und mit dichter Interzellularsubstanz gefüllt. In Bereichen mit stärker geweiteten Interzellularspalten liegt der dunkle Interzellularkitt oft im Zentrum des Interzellularspalt, wobei der Raum zwischen dem Interzellularkitt und der Zelloberfläche mit Exsudat gefüllt ist (Abb. 8a und 8d). In Bereichen mit geschrumpfter Epidermis werden die Zellen zunächst von einem breiten Streifen Exsudat im Interzellularspalt flankiert (Abb. 8c). Weiterhin befindet sich im Zentrum des Interzellularspalt ein elektronendichter

Interzellularkitt. Die Trennung geschrumpfter Zellen voneinander durch Lösung der Desmosomen führt vereinzelt zu isolierten Zellen (Abb. 8a und 8c). Dort sind die Interzellularspalten zum Teil bis zu 10 µm weit. Erythrozyten und andere korpuskuläre Blutbestandteile stecken vereinzelt in den Interzellularspalten zwischen den Epidermiszellen. Fibrin ist in manchen Bereichen anzutreffen. Im oberen Stratum spinosum sind annular gap junctions (AGJ) ausgebildet (Abb. 8e). Sie haben ein pentalaminäres Profil von insgesamt 18 nm Dicke mit einem 2 bis 3 nm engen interzellulären Spalt. Sie treten im Zytoplasma zumeist in runder Form auf, in der Zellperipherie sind auch tennisschlägerartige Formen anzutreffen. Sie stellen Kontakte an Einstülpungen einer Zelle in eine andere dar und behalten teilweise Verbindung zum Interzellularspalt oder werden vollständig vom Interzellularspalt abgeschnürt. Der Inhalt der AGJ besteht aus eingeschlossenem Zytoplasma, Ribosomen und Organellen.

Die Zellen des Stratum granulosum sind auffallend hell. Sie sind mit einem feinfaserig-granulären Zytoplasma und Keratohyalin granula gefüllt. Karyolytische Zellkerne sind in vielen Granulosazellen anzutreffen.

Der Interzellularspalt ist unterschiedlich stark geweitet. In manchen Bereichen ist er gleichmäßig breit, z.T. leicht geweitet und mit Exsudat gefüllt. In anderen Bereichen ist er verstärkt geweitet, aber nur partiell mit Interzellularkitt gefüllt. In diese Interzellularspalten sind zusätzlich zum Exsudat auch Erythrozyten und Entzündungszellen eingewandert. Stellenweise sind die Interzellularspalten auch im Stratum granulosum derart stark geweitet, dass die benachbarten Zellen nur noch über wenige desmosomentragende Zellfortsätze miteinander verbunden sind (Abb. 8c).

3.3 Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 10

Am Tag 10 der Wundheilung des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs vom Tier Nr. 28 enthalten die Zellen des Stratum corneum viele Lipidtropfen in den sonst homogenen Hornmassen. Gelegentlich ist ein Zellkernrest zu finden.

Die Interzellularspalten verlaufen an den Flanken der Hornzellen mäanderförmig und an der Ober- und Unterseite nahezu geradlinig. Im Bereich der Desmosomenreste liegen die benachbarten Hornzellmembranen dicht beieinander. Die meisten Desmosomenreste befinden sich an den Flanken der Zellen. Im Bereich der Ober- und Unter-

seite ist der Zusammenhalt zwischen dem Interzellularkitt und der angrenzenden Zelloberfläche gestört. Hier sind die Zellmembranen zum Teil auseinander gewichen und hinterlassen ungefüllte Interzellularspalten oder Mikrorisse. Enge Interzellularspalten sind mit einem dünnen Film aus Interzellularkitt gefüllt. An den Flanken sind blasenförmige Erweiterungen des Interzellularspaltes zentral mit elektronendichtem Interzellularkitt gefüllt. Peripher ist der Interzellularkitt von den Hornzellmembranen abgelöst, wodurch optisch leere Spalten entstehen (Abb. 7f). An anderen Stellen sind die interdesmosomalen, erweiterten Interzellularspalten mit unterschiedlich elektronendichtem Interzellularkitt vollständig gefüllt (Abb. 8f).

4. Exemplarische Befunde vom Tier 28 am Tag 15

4.1 Befunde in der Dermis am Tag 15

In den beiden Proben des RUSTERHOLZ-Geschwürs vom Tier Nr. 28 vorhandene dermale Anteile zeigen vollkommen kollagenfaserentleerte Papillenspitzen, die abgesehen von Resten vereinzelter undefinierbarer Zellen und Resten der in Auflösung begriffenen Blutgefäße optisch leer sind (Abb. 9a).

4.2 Befunde in der epidermalen Matrix am Tag 15

Die bis zum 15. Tag der Heilung neu gebildeten Epidermiszellen in den Proben des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs des Tieres Nr. 28 gleichen lichtmikroskopisch nur zum Teil gesunden Zellen. Zwischen den Basalzellen sind immer wieder Granulozyten eingefügt (Abb. 10a). Die überwiegend dyskeratotischen Spinosazellen sind auffallend hell, ihr Zytoplasma ist aufgelockert (Abb. 9b). Die Betrachtung der Präparate im Transmissionselektronenmikroskop ergibt hier ein Fehlen der charakteristischen Orientierung der verminderten Keratinfilamente in den Spinosazellen als Ursache für die lichtmikroskopisch erhobenen (verminderten) Färbereigenschaften. Außerdem ist das Keratinfilamentgerüst nur locker gefügt und Organellen sind fragmentiert. Reste von Tubuli des rauhen endoplasmatischen Retikulums sind lokal vorhanden. Zellkerne sind degeneriert und partiell karyolytisch. Die räumliche Anordnung im Zellverband ist überwiegend gewebespezifisch ausgebildet. Viele Zellen sind jedoch geschrumpft. Ein marginales Band ist in vereinzelten Fällen auf dem inneren Blatt der

Zellmembran oberer Spinosazellen abgelagert (Abb. 10b).

Der Interzellularspalt ist immer wieder auf langen Strecken erweitert. Er ist zwischen den Desmosomen zentral mit dichtem Interzellularkitt gefüllt, der beiderseits bis an die Zellmembranen heran von Exsudat flankiert wird (Abb. 9c). Viele dieser erweiterten Interzellularspalten sind auch ausschließlich mit lockerem Material gefüllt, wobei an den Zellmembranen noch geringe Mengen von Interzellularkitt haften (Abb. 10d). In anderen Bereichen ist der Interzellularkitt insgesamt stärker konzentriert und elektronenoptisch dichter oder von filamentöser Beschaffenheit (Abb. 10b). Dort ist der Interzellularspalt neben weiten Abschnitten über lange Strecken eng (Abb. 10c).

Eine deutliche Verhornungsgrenze fehlt, man findet nur eine Art Verhornungsregion, was für eine gestörte zeitliche Koordination bei der Differenzierung der Zellen spricht (Abb. 9d). In dieser Region sind wenig Zellen mit vereinzelt Keratohyalin granula zu finden.

4.3 Befunde in der verhornten Epidermis am Tag 15

Der intermediäre Bereich des Stratum corneum zeigt lichtmikroskopisch in den Proben vom Tier Nr. 28 einen Wechsel von filamentösen Hornmassen und basophilen, homogenen Interzellularkittmassen in stark geweiteten Interzellularspalten im ungeordneten Hornzellverband (Abb. 9e). Lipidtropfen sind in großer Zahl in den Hornzellen anzutreffen. In einigen Bereichen liegen die Zellen über lange Distanzen voneinander getrennt, ohne Kontakt über Desmosomen aufzunehmen. In Arealen enger aneinander liegender verhornter Epidermiszellen sind die Desmosomen vermindert. In Bereichen, in denen der Interzellularspalt schmal ist, verläuft er in zahlreichen hohen Mäandern. Leicht geöffnete spindelförmige Erweiterungen des Interzellularspaltes wechseln sich mit langen Desmosomen ab (Abb. 10c). Die erweiterten Abschnitte sind nur unvollständig mit lockerem Interzellularkitt gefüllt.

5. Befunde am Tag 20

5.1 Befunde in der Dermis

5.1.1 Die Dermis im Wundzentrum am Tag 20

Zwei Proben sind hier besonders repräsentativ für das Wundzentrum.

Die Blutgefäße sind in den basalen Abschnitten der Lederhautpapillen im Bereich des Wundzentrums meist dilatiert und mit Erythrozyten, Thrombozyten und Blutplasma thrombosiert. Auch einige Granulozyten sind beteiligt. Mit zunehmender Nähe zum Wundzentrum nimmt der Anteil an Thrombozyten in den Gefäßen so stark zu, dass diese hier nur noch Thrombozytenpfropfe enthalten (Abb. 11d). In den apikalen Bereichen der erhaltenen wundnahen Papillen sind die Blutgefäße weit und teils mit reinem Plasma, teils auch mit korpuskulären Blutbestandteilen gefüllt (Abb. 11a). In Bereichen, in denen die Epidermis sehr stark verändert ist, sind wenige Lederhautpapillen anzutreffen, in denen die Blutgefäße ebenfalls thrombosiert sind. Die Endothelzellen weisen Zellkerne mit Kernwandhyperchromasie auf.

Neben den Blutgefäßen füllt ein unterschiedlich kompaktes, faseriges, zellreiches Bindegewebe die Lederhautpapillen aus. Die Kollagenfasern sind im Wundzentrum leicht gequollen und liegen zum Teil gebündelt, zum Teil einzeln und in alle Richtungen orientiert. Die Blutgefäße umgibt ein kompakter, geschlossener Kollagenfaserverband. Die Bindegewebszellen sind peripher zahlreich und nehmen zum Zentrum hin ab. Viele Anschnitte von Fortsätzen der Bindegewebszellen enthalten einen lockeren, feinkörnigen Inhalt.

Im Bereich aufgelöster Basalzellen kann man die Existenz der Lamina rara externa nur im Bereich der Reste von Hemidesmosomen erkennen. Die darauf folgende elektronendichte Lamina densa enthält massenhaft Verdoppelungen und Verdickungen. In der Tiefe des Wundtrichters verliert sich die Lamina densa. Einige apikale Abschnitte der Lederhautpapillen sind aus dem dermoepidermalen Verband partiell bis komplett herausgezogen, und die entstandenen Höhlen sind mit Erythrozyten gefüllt (Abb. 11a). Dabei ist die Trennung ebenfalls durch die Basalzellen erfolgt, wobei die vier Zonen der Basalmembran zusammenhängend und intakt geblieben sind.

5.1.2 Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 20

In der Wundperipherie sind die Blutgefäße in basalen Anschnitten der Lederhautpapillen nicht bis leicht mit Blutplasma oder korpuskulären Blutbestandteilen gefüllt. Das Lumen ist schlitzförmig bis leicht geöffnet. Basal finden sich weiterhin viele kleine Blutgefäße mit einem dichten Besatz an Endothelzellkernen, die mit einem Kernpol in Richtung des leicht geöffneten Blutgefäßlumens ausgerichtet sind. Stellenweise sind Erythrozyten aus den Blutgefäßen in das umgebende Bindegewebe ausge-

treten und sind dort zu Paketen verbacken. Dabei haben die Erythrozyten auch die dermoepidermale Grenze überwunden und befinden sich epidermal (Abb. 11a). In apikalen Bereichen der Lederhautpapillen sind die Blutgefäße dilatiert und meist thrombosiert. Das papilläre Bindegewebe zeigt sich lichtmikroskopisch meist kompakt, straff und dicht. Bindegewebszellen sind gleichmäßig zwischen den Kollagenfasern verteilt und nehmen einen recht geringen bis mittelmäßigen Anteil am gesamten Bindegewebe ein. Die Zellkerne einiger Fibroblasten zeigen Kernwandhyperchromasie. In apikalen Papillenbereichen ist gelegentlich ein Auflockern des Bindegewebes mit Entstehung von Löchern und Rissen zu verzeichnen. Mit transmissionselektronenmikroskopischer Technik ist erkennbar, dass die Kollagenfasern in unregelmäßigen Abschnitten teils locker gefügt, teils dicht gepackt sind. In der Zirkumferenz von Blutgefäßen sind sie als schmaler Saum dicht gebündelt und verlaufen kreisförmig um die Blutgefäße herum. Lokal fehlt die gesamte Basallamina. Die meisten Proben zeigen geringere strukturelle Abweichungen von der Norm. Daher wurden sie der Wundperipherie zugeordnet.

5.2 Befunde in der epidermalen Matrix

5.2.1 Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 20

Die lebende epidermale Matrix ist im Wundzentrum stark verändert. An der Wundkante beherrschen Blutflüssigkeit und ausgetretene Erythrozyten das Bild. Die dermoepidermale Grenze ist von Extravasaten und Exsudat umgeben, wobei die Epidermis von der Dermis größtenteils abgelöst ist. Die Trennung zur Epidermis ist auf der Höhe des Stratum basale mitten durch die Zellen erfolgt. Die Basalzellen sind größtenteils zerstört, und die einzelnen Degenerationsprodukte sind von feingranulärer, unterschiedlich lockerer Substanz umgeben. Es sind keine intakten Basalzellen zu erkennen. Die an der Grenze zur Dermis lichtmikroskopisch erkennbare feingestrichelte Linie stellt sich transmissionselektronenmikroskopisch als dichte Bündelung der Keratinfilamente der zerstörten Basalzellen dar, die zu den Hemidesmosomenresten ziehen und im Verbund mit der Basallamina erhalten geblieben sind. Lokal sind im Bereich des Stratum basale auch Anteile intrazellulärer Keratinfilamente erkennbar.

Der darauf folgende Bereich, wo das Stratum spinosum zu erwarten wäre, ist mit einem Gemisch aus dicht gepackten, zusammenhangslosen Erythrozyten, Keratinfil-

lamentbündeln, Zelltrümmern, Granulozyten und Lymphozyten ausgefüllt (Abb. 11c). Der Bereich erstreckt sich bis unter das Stratum corneum. Erst mit zunehmender Entfernung vom Wundzentrum werden die Zellen abgrenzbar und bilden einen Zellverband, in dem die Keratinisierung jedoch gestört ist.

Neben engen Interzellularspalten, die mit gleichmäßig feinflockigem, lockerem Material vollständig gefüllt sind, kommen geweitete Interzellularspalten vor, in denen der Interzellularkitt aus einer Ansammlung verschieden elektronendichter Materialien besteht (Abb. 12c). Die stärker elektronendichten Substanzen werden im weiteren Verlauf der Differenzierung - also in höheren Zellschichten - in ihre Bestandteile aufgetrennt und als Interzellularkitt gleichmäßig im Interzellularspalt verteilt.

Anschnitte von vordringenden Granulozyten bzw. von deren Fortsätzen bahnen sich ihren Weg durch erweiterte, exsudatgefüllte Interzellularspalten (Abb. 12d).

Von dieser stark veränderten Epidermis hebt sich die Verhornungsgrenze besonders deutlich ab. Sie stellt den Übergang des nekrotischen, erythrozytengefüllten Stratum spinosum zum nahezu intakt erscheinenden Stratum corneum dar. An der Kante zum Wundkrater biegt die Verhornungsgrenze unvermittelt bogenförmig um 90 Grad um und ist dann senkrecht zur Dermis orientiert (Abb. 11e und 11f).

Im Vergleich mit den vorangegangenen Stadien am Tag 0 bis 15 stellt dieses Stadium zum Zeitpunkt der Probenentnahme, in dem die epidermale Matrix im Wundzentrum komplett nekrotisiert und mit Extravasaten gefüllt ist, eine deutliche Verschlechterung der Situation dar.

5.2.2 Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 20

In der Wundperipherie der heilenden RUSTERHOLZschen Klauengeschwüre sind die Nuklei der Zellen des Stratum basale heterochromatisch. Zu diesem Zeitpunkt ist der perinukleäre Zytoplasmasaum der peripapillären und suprapapillären Basalzellen in einigen Proben immer schaumartig aufgehellte (Abb. 11b). Dieser Saum besteht überwiegend aus degenerierten Mitochondrien mit Verlust an Cristaemembranen. Bei geringem Keratinfilamentgehalt in den Basalzellen sind die Filamente locker und verlaufen in alle Richtungen. Mitosen treten bevorzugt in den interpapillären Vertiefungen auf. Fremdzellen, meist Granulozyten und Lymphozyten, liegen zwischen den Basalzellen.

Zwischen den Basalzellen fallen teils geweitete, leere Interzellularspalten auf. Andere Interzellularspalten sind blasenförmig geweitet und mit Exsudat gefüllt. An den Papillenspitzen sind die Interzellularspalten zwischen den Basalzellen enger.

Das Zytoplasma der unteren Zellen des Stratum spinosum enthält hier neben den Keratinfilamenten überwiegend Ribosomen, gefüllte membrane coating granules, Speichervesikel mit enthaltenem lockerem Material und auch degenerierte Mitochondrien (Abb. 12b). Um den Zellkern bleibt ein filamentfreier Saum. In manchen Spinosazellen sind vereinzelte Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums blasenförmig dilatiert. In oberen Schichten aggregieren die Keratinfilamente zu dickeren Bündeln und nehmen dabei immer mehr Raum in der Zelle ein. Zum Teil sind sie in der Zelle parallel zur Verhornungsgrenze orientiert, in einigen Präparaten lassen sie keine einheitliche Verlaufsrichtung erkennen. In peripapillären Spinosazellen verlaufen sie auch häufig noch parallel zur Papillenlängsachse, um dann weiter oben die Verlaufsrichtung der Filamente in den interpapillären Zellen anzunehmen. Die Zellkerne der unteren Spinosazellen sind heterochromatisch. In oberen Lagen werden sie zunehmend karyolytisch. Im oberen Stratum spinosum kommen lokal gefurchte Zellkerne vor (Abb. 12a). Das obere Stratum spinosum einiger Proben weist Störungen in der Keratinisierung auf, die sich unterschiedlich darstellen. Meist bleiben nur Bündel von Keratinfilamenten erhalten, während das umgebende Zytoplasma vollständig aus den Maschen herausgelöst ist. Manchmal nimmt der Zellinhalt auch homogene Beschaffenheit an, in der sich die Keratinfilamentbündel nicht mehr abgrenzen lassen.

Die weiten, ungefüllten Interzellularspalten setzen sich zunächst über ein paar Zellschichten fort. Mit fortschreitender Ausreifung der Spinosazellen und deren Nachschub in höhere Schichten sind sie zunehmend enger gelagert und der Interzellularspalt ist mit Interzellularkitt gefüllt. Zunächst ist der Interzellularkitt noch sehr unterschiedlich beschaffen. Massen von verschieden elektronendichtem Interzellularkitt füllen die weiten Interzellularspalten (Abb. 12c). Dann erreicht der Interzellularkitt bald die gleiche Elektronendichte wie das Zytoplasma zwischen den Keratinfilamenten, die stetig zunehmen. Desmosomen und wenige gap junctions, aber zahlreiche annular gap junctions vermitteln den Kontakt zwischen den Spinosazellen (Abb. 12e).

In zwei Dritteln der Präparate ist am 20. Wundheilungstag ein mehr oder weniger deutliches Stratum granulosum mit intrazellulären Keratohyalingranula ausgebildet. Die Keratohyalingranula sind in den Zellen diffus verteilt und haben unterschiedliche

Größe. Die Proben enthalten je nach Lokalisation entweder nur vereinzelt keratohyalin granulohaltige Zellen oder ganze Zellschichten, deren Zellen massiv mit Keratohyalin granula gefüllt sind. Dabei finden sich die Keratohyalin granula in den Geschwürproben am häufigsten (32 %) in den suprapapillären Epidermiszellen in Höhe der Verhornungsgrenze.

Im interpapillären Bereich kommt es an der Verhornungsgrenze zur Abflachung der jungen Hornzellen sowie ihrer Ausrichtung quer zur Zellvorschubsrichtung. An den meisten Stellen erfolgt die Aggregation der Keratinfilamente abrupt zu einer nahezu homogenen, manchmal leicht marmorierten Hornmasse. Diese Vorgänge sind in benachbarten Zellen zeitlich koordiniert. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Färbintensität der Zellen zu verzeichnen. Stellenweise erfolgen die Abflachung der Zellen und die Aggregation der Keratinfilamente zeitlich versetzt. Dann treten im oberen Stratum spinosum bzw. Stratum granulosum vorzeitig verhornte Zellen auf. Diese liegen dann einzeln oder in Zellnestern unterhalb der Verhornungsgrenze und werden mit den übrigen Zellen nach oben in den Bereich des Stratum corneum geschoben. So finden sich neben unverhornten Zellen auch abgerundete, verhornte Zellen, in denen die Keratinfilamente bereits zu homogenen Hornmassen verbacken sind. Der Interzellularspalt zwischen der oberen Spinosazellen- bzw. Granulosazellen- und den ersten Hornzellen ist locker mit Interzellularkitt gefüllt. Desmosomen sind hier regelmäßig zu finden. Sie halten die gegenüberliegenden Zellmembranen auf kurze Distanz, die in den interdesmosomalen Bereichen wieder auseinander weichen, so dass sich im Interzellularspalt locker gefüllte, blasige Erweiterungen bilden.

5.3 Befunde in der verhornten Epidermis

5.3.1 Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 20

Im Zwischenröhrchenhorn sind die Hornzellen des Wundzentrums stets parallel zur Verhornungsgrenze angeordnet. Zum Wundkraterrand hin biegt die gesamte Verhornungsgrenze einschließlich einiger proximal von ihr liegender oberer Spinosazellschichten im rechten Winkel in Richtung Dermis ab (Abb. 11e und 11f) und ist rechtwinkelig zur Verhornungsgrenze orientiert.

Die nahezu homogene Keratinmasse ist stellenweise zusätzlich von feinen unmaskeierten Keratinfilamenten unterbrochen. Die Hornmassen und der Interzellularkitt verschmelzen oberflächlich teilweise zu einer einheitlichen Masse.

Der Interzellularspalt ist zwischen den Hornzellen zunächst in den ersten tiefen Schichten noch leicht geweitet und enthält Interzellularkitt in unterschiedlicher Dichte und Verteilung (Abb. 12f). Zwischen Desmosomenresten ist er schmal. Auch Reste von annular gap junctions kommen im Stratum corneum vor (Abb. 8e). Der stark mäanderförmige Verlauf der Zellgrenzen an den Zellflanken und der flache wellenförmige Verlauf an der Zellober- und -unterfläche bleiben über viele Zelllagen erhalten. Zwischen übereinander liegenden Zellen kommt es aufgrund gestörten Zusammenhaltes von Interzellularkitt und Zelloberfläche zu optisch leeren Mikrorissen. Risse zwischen den Hornzellen haben im Bereich der abgebogenen Verhornungsgrenze meist ovale Form (Abb. 11f).

Die Hornröhrchen sind in tiefen Lagen locker und oberflächlich dicht mit suprapapillärem Röhrchenmark gefüllt.

5.3.2 Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 20

Im Zwischenröhrchenhorn werden in der Wundperipherie am Tag 20 einige intrazelluläre Filamente in den jungen, tiefen Hornzellen nicht maskiert. Ansonsten sind die Keratinfilamentbündel restlos zu homogenen Hornmassen verbacken und füllen die abgeplatteten Zellen komplett aus. In Bereichen, in denen in der lebenden Epidermis ein deutliches Stratum granulosum mit Keratohyalin granula ausgebildet ist, persistieren in den tiefen Schichten des Stratum corneum ebenfalls Keratohyalin granula in geringer Menge. In der Peripherie der Reste der sonst aufgelösten Zellkerne sammeln sich zunehmend Lipidtropfen. An der Innenseite der Zellmembran mancher junger Hornzellen ist ein marginales Band zur Verstärkung der cornified cell envelope angelagert (Abb. 12e). Nach ca. 50 Hornzelllagen zerfällt das Horn an der Oberfläche und die Zellgrenzen werden undeutlich.

Die Interzellularspalten des Stratum corneum sind eng und locker mit Interzellularkitt gefüllt. An den Zellflanken verlaufen sie stark mäanderförmig und an den Ober- und Unterseiten nur leicht wellenförmig. Desmosomenreste sind zahlreich bis massenhaft zu finden. Mikrorisse zwischen übereinander liegenden Hornzellen kommen vereinzelt vor.

Das Röhrchenhorn zeigt eine lockere Struktur aus homogenen Hornmasseklumpen in lockerem, löchrigem Zellmaterial. Damit sind die Röhrchen komplett ausgefüllt.

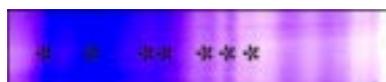
5.3.3 Elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn am Tag 20

In der folgenden Übersicht über die aufgetrennten Zellproteine sind die unterschiedlichen Banden mit ihrer unterschiedlichen Dicke schematisch abgebildet, wie sie sich nach SDS-PAGElektrophoretischer Auftrennung auf dem Gel darstellen:

Tabelle 4: Übersicht über die aufgetrennten Zellproteine in Hornproben von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren am Tag 20 der Heilung (Darstellung gleicht Tabelle 3, Kap. D.1.3.3)

Probe	T8 G2	T8 K1	T11G2	T11K1	T21G2	T21K1	T22G2	T22K1
Biotin	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja
43 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
45-50 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
54 kd	————	————	————	————	————	————	————	————
56-58 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
63 kd	————	————	————	————	————	————	————	————
67 kd	————	————	————	————	————	————	————	————
69 kd	————	————	————	————	————	————	————	————
>93 kd	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====

Textabbildung 4: Bandenstruktur am Beispiel des Proteinextraktes von Tier 11, die für den Tag 20 repräsentativ ist



Wanderungsrichtung der Proteine

In der Tabelle 4 sind neben den Proben vom Tag 20 (G2) auch noch einmal die Bandenmuster der Referenzproben vom Tag 0 (T8 K1, T11 K1, T21 K1 und T22 K1) aufgeführt, die als Grundlage für "gesundes" Horn herangezogen werden.

Verglichen mit den Ergebnissen vom Tag 0 der Heilung und mit den Referenzproben (s. Kap. D.1.3.3) werden Proteine der gleichen Molekulargewichte in den Extrakten des Stratum corneum isoliert und nachgewiesen. Die Intensität der Banden ist entsprechend des Gesamtproteingehaltes in den Extrakten schwächer bis stärker. Das Vorkommen und die Breite der Banden ist mit den Proben vom Tag 0 vergleichbar.

Trotz starker morphologischer Veränderungen in den histologischen Präparaten werden keine elektrophoretischen Unterschiede gefunden.

6. Befunde am Tag 50

6.1 Befunde in der Dermis

6.1.1 Die Dermis im Wundzentrum am Tag 50

Zwischen Tag 20 und Tag 50 wurden keine Zwischenstadien untersucht.

Am Tag 50 wurden die Tiere vor der Probenentnahme geschlachtet. Dadurch wurde die Möglichkeit einer schmerzfreien invasiven Entnahme größerer Proben und tiefer liegender Gewebeschichten geschaffen.

Im Stratum reticulare der Dermis sind die Blutgefäße am Tag 50 im Wundzentrum dilatiert. Bei dünner Gefäßwand ragen zahlreiche Endothelzellkerne, die mit einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben sind, in das leere Gefäßlumen (Abb. 13a). Andere Blutgefäße sind mit Erythrozyten und Plasma gefüllt. Im Wundzentrum ist eine höhere Dichte an Blutgefäßen zu verzeichnen als in der Wundperipherie (Abb. 13b). Das Bindegewebe ist dicht, kompakt und zeigt nur wenig Spalten zwischen den lichtmikroskopisch gequollen Bindegewebsfaserpaketen. Stellenweise sind vermehrt Bindegewebszellen mit deutlichem rauhen endoplasmatischem Retikulum anzutreffen. In anderen Regionen ist das Bindegewebe mit seinen Kollagenfasern aufgelockert. Einzelne Granulozyten nehmen sehr engen Kontakt zu Fibroblasten auf (Abb. 14c). Degenerierte Lymphozyten mit erweitertem perinukleärem Spalt und Cristaemembranenverlust in den Mitochondrien kommen vereinzelt vor (Abb. 14b).

Ein Papillarkörper im Wundzentrum ist ausgeprägt. Die Papillen sind jedoch in einigen Fällen in Durchmesser, Form, Anordnung und Verlauf innerhalb ein und derselben Probe sehr unterschiedlich.

Basale Anschnitte der Papillen zeigen dilatierete Blutgefäße, die locker mit Blutbestandteilen, v.a. mit Erythrozyten gefüllt sind. Einige Blutgefäße enthalten zusätzlich zu den Erythrozyten zahlreiche Entzündungszellen, die in Blutplasma eingebettet sind. Auch leere Blutgefäße kommen vor. In den apikalen Papillenabschnitten sind die schmalen Blutgefäße auch am 50. Tag noch mit Erythrozyten thrombosiert (Abb. 14a). Auf gleicher Höhe in benachbarten Papillen können die Lederhautgefäße an der Papillenspitze unauffällig sein (Abb. 13d). Das Bindegewebe stellt sich licht-

mikroskopisch gequollen (Abb. 13c) und transmissionselektronenmikroskopisch kompakt dar. Zwischen den Faserpaketen bestehen nur wenig Lücken. Transmissionselektronenmikroskopisch ist eine intakte Basalmembran nachweisbar. Die Lamina densa ist stellenweise etwas verdickt (Abb. 14e). Zahlreiche Hemidesmosomen verknüpfen die Zellmembranen der Basalzellen auf der Basallamina (Abb. 14f).

6.1.2 Die Dermis in der Wundperipherie am Tag 50

Im Stratum reticulare der Dermis sind in der Wundperipherie die Lumina der zahlreichen Blutgefäße verschlossen. Auch hier stecken vereinzelte Erythrozyten im engen Lumen der Blutgefäße, in das andererseits Endothelzellkerne hineinragen, die von einem schmalen Zytoplasmastreifen umsäumt sind (Abb. 13a). Dickwandige Blutgefäße sind bis auf einen schmalen Spalt lumenlos und enthalten vereinzelt Erythrozyten. Das Bindegewebe besteht stellenweise aus dichten Kollagenfaserpaketen, anderenorts sind die Kollagenfaserpakete aufgelockert. Die einzelnen Fasern verlaufen dann teils geordnet, teilweise in alle Richtungen. Sehr selten kommen Granulozyten im Bindegewebe vor.

Der Papillarkörper ist zum Teil sehr unregelmäßig aufgebaut, weil Form, Anordnung, Durchmesser und Ausrichtung der Papillen stark variieren. Die meisten Papillen sind auf der gesamten Länge gleichmäßig dünn und schlank und enden abgerundet, manche beginnen dicker als die schmalen Exemplare, sind plump und enden kegelförmig unter der Verhornungsgrenze. Ein Teil der Papillen biegt erst nach kurzem senkrechten Verlauf bogenförmig um, ein anderer Teil zieht sofort im spitzen Winkel zur basalen Lederhautfläche oberflächenwärts und erscheint zunehmend bogenförmig. Eine leichte Kannelierung ist regelmäßig zu erkennen.

In basalen Abschnitten der Lederhautpapillen ist das Bindegewebe locker. Blutgefäße sind hier mit einzelnen Erythrozyten gefüllt. In manchen Bereichen findet man auch kollabierte Blutgefäße mit zytoplasmaumsäumten Endothelzellkernen, die in das Innere der Gefäße hineinragen. In anderen Arealen sind viele Blutgefäße ballonartig dilatiert und peripher mit vereinzelt Erythrozyten angefüllt. Entzündungszellen kommen in wenigen Fällen vor. Mittels transmissionselektronenmikroskopischer Technik lassen sich diese Zellen als Granulozyten und Lymphozyten identifizieren. Der Zellgehalt ist hier dichter als im Stratum reticulare. Der Zelleib einiger Fibroblasten wird von zahlreichen deutlichen und locker gefüllten Schläuchen des rauhen endoplasmatischen Retikulums ausgefüllt (Abb. 14d). Lymphozyten mit

enorm geweitetem perinukleären Spalt und rauhen endoplasmatischen Retikulum liegen vereinzelt im Bindegewebe (Abb. 14b).

Apikal in den Papillen ist das Bindegewebe zunehmend gequollen (Abb. 13c). Das lichtmikroskopische Bild bestätigt sich bei transmissionselektronenmikroskopischer Betrachtung, wo die Kollagenfasern nicht einzeln begrenzt sind, sondern sich als fast homogene Masse in dichten Paketen darstellen. Spalten und Löcher zwischen den Bindegewebspaketen sind hier rar. Die Blutgefäße sind zur Papillenspitze zunehmend mit Plasma oder zusammengelagerten Thrombozyten gefüllt. Einige sind auch in der Wundperipherie mit Erythrozytenaggregaten thrombosiert (Abb. 14a). In einigen Papillenspitzen dominieren weite, leere Blutgefäße. In anderen überwiegen kleine englumige Blutgefäße, in denen partiell einzelne Erythrozyten stecken. Rote Blutkörperchen sind auch per diapedesin in das umliegende Bindegewebe ausgetreten. Im perinukleären Zytoplasma einiger Bindegewebszellen treten gehäuft Mitochondrien mit aufgelösten Cristaemembranen auf. Vereinzelt sind so lädierte Mitochondrien auch in Endothelzellen zu finden.

Die Lamina densa bzw. Basallamina liegt der Zytoplasmamembran der Basalzellen häufig so dicht an, daß keine Lamina rara externa ausgebildet ist. Über Distanzen von 50 bis 100 nm ist die gesamte Basallamina unterbrochen (Abb. 14e), setzt sich danach aber wie gewohnt fort. Verdoppelungen und Schwellungen der Basallamina kommen vor (Abb. 14e). Der Besatz mit Hemidesmosomen ist bereichsweise sehr dicht (Abb. 14f).

6.2 Befunde in der epidermalen Matrix

6.2.1 Die epidermale Matrix im Wundzentrum am Tag 50

Die Basalzellen der epidermalen Matrix sind im Wundzentrum lokal zerstört und von der Dermis abgelöst (Abb. 14a). Nur die Wurzelfüßchen und basalen Zellpole der Basalzellen haben noch Kontakt zu den Lederhautpapillen. Mit der Papillendermis in Verbindung gebliebene Zellen des Stratum basale sind meist degeneriert. Der Zellkern ist pyknotisch. Einzelne isolierte Keratinfilamente liegen ohne jeglichen Kontakt zum restlichen Zytoplasma frei um den Zellkernrest. Erythrozyten sind in diesen Basalzellbereich eingedrungen und stecken zwischen den Zellresten. In einigen Proben sind die Zellkerne der unteren interpapillären Basalzellen von einem Kranz aus degenerierten Mitochondrien umsäumt (Abb. 15a). Die Filamente sind in diesen

Zellen an die Zellperipherie gerückt. Transmissionselektronenmikroskopisch bestätigt sich der Verdacht, dass die Cristaemembranen der Mitochondrien fehlen. In intakten Bereichen sind die Basalzellen zahlreich und klein. Neben Melanozyten (Abb. 15e) liegen auch Fremdzellen wie Granulozyten und Lymphozyten (Abb. 15d) zwischen den Basalzellen. Mitosen kommen dort in den epidermalen Vertiefungen an den Basen der Lederhautpapillen bevorzugt vor.

Die Interzellularspalten zwischen den Basalzellen sind weit. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchung erscheinen sie optisch leer oder sind mit einer feingranulierten bis homogenen Substanz gefüllt, die z.T. in Vesikeln verpackt ist.

Im Stratum spinosum der RUSTERHOLZschen Klauengeschwüre herrschen im Wundzentrum noch immer schwere intrazelluläre Keratinisierungsstörungen vor. Diese äußern sich darin, dass die Keratinfilamente meist vereinzelt oder gebündelt in den zytoplasmadefizienten Zellen liegen (Abb. 13e). Die Keratinfilamente orientieren sich bei weiterer Differenzierung trotzdem rasch parallel zur Richtung der Verhornungsgrenze. Von den Zellkernen bleiben karyolytische Reste übrig (Abb. 13e). Die Verbindung des Kernrestes zum Zytoplasma ist fast vollständig unterbrochen (Abb. 15b). Sofern der perinukleäre Saum der Spinosazellen nicht aus degenerierten Mitochondrien besteht, ist er optisch leer. Die Spinosazellen sind in den unteren Schichten lichtmikroskopisch nicht und transmissionselektronenmikroskopisch nur sehr undeutlich voneinander abzugrenzen, weil die Zytoplasmamembran ihre typische, deutliche trilamelläre elektronendichte Struktur eingebüßt hat und in vielen Bereichen nicht zu verfolgen ist. Die sich gegenüberliegenden Zellmembranen sind durch vereinzelte Desmosomen verknüpft. In diesen Bereichen, meist in der Zellperipherie, kommen annular gap junctions (AGJ) vor, die Keratinfilamentquerschnitte und Zytoplasma umschließen. In den unteren Lagen des Stratum spinosum finden sich gelegentlich Granulozyten.

Durch die Anlagerung von Keratinfilamenten an die Innenseite der Zytoplasmamembran entsteht in den oberen Spinosazellschichten eine lichtmikroskopisch kontrastreiche dreischichtige Struktur, in der sich der Interzellularspalt als mittleres, schmales helles Band abhebt (Abb. 13e). Dabei sind die Zellen oft nur halb mit Zytoplasma angefüllt, wobei eine Konzentration des Zytoplasmas meist in der Zellperipherie erfolgt. Stellenweise sind die Filamente bereits in den oberen Spinosazellen zu kräftigen, dicken Keratinfilamentbündeln aggregiert.

Der in interdesmosomalen Bereichen meist weite, stellenweise blasig erweiterte Interzellularspalt ist mit einem elektronenoptisch lockeren Interzellularkitt nur teilweise und an wenigen Stellen vollständig gefüllt.

Ein Stratum granulosum im Zentrum der Geschwürwunden ist am Tag 50 nur in einem Fall nachweisbar.

Im Bereich der geradlinigen Verhornungsgrenze erfolgt das Verbacken der Keratinfilamente meist abrupt. Die deutliche Abflachung der Zellen geht jedoch zeitlich nicht mit der Verhornung zu nahezu homogenen Hornmassen einher, sondern findet zum Teil verzögert, zum Teil vorzeitig statt. Die Synchronisation der Verhornung mit den übrigen benachbarten Zellen ist bei einzelnen Zellen oder kleinen Zellgruppen gestört.

6.2.2 Die epidermale Matrix in der Wundperipherie am Tag 50

Die Dicke der lebenden Epidermis wurde anhand der Gefrierschnitte der Geschwürproben G3, G4, G1.1 und G 2.2 vom Tag 50 lichtmikroskopisch ermittelt. Von den Tagen 0 und 20 liegen keine Gefrierschnitte vor, weil die Größe der minimalinvasiv entnommenen Biopate von diesen Entnahmetagen für beide Untersuchungen, Gefrierschnitte und elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine, leider nicht ausreichte.

Idealerweise wurde anhand der Proben G3 und G4 die Epidermisdicke gemessen, die sich nach dem Ausschneiden der Geschwüre von Tag 0 bis Tag 50 entwickelt hat. Bei der Probe G1.1 wurde die Dicke gemessen, die nach der ersten Probenentnahme am Tag 0 bis zum Tag 50 gebildet wurde und mit der Probe G 2.2 wurde die Epidermisdicke ermittelt, die sich nach der zweiten Probenentnahme am Tag 20, also innerhalb von 30 Tagen wieder aufgebaut hat.

Bei der Dickenmessung wurde von der Basis zwischen den interpapillären Vertiefungen senkrecht bis zum Beginn des Stratum corneum gemessen. Minimal betrug die Dicke 0,7 mm (Tier 16, Geschwür 3), maximal 4,1 mm (Tier 27, Geschwür 1.1.). Dabei schwanken die Werte innerhalb einzelner Proben z.B. zwischen 3,7 mm und 1,0 mm (Tier 25, Geschwür 1.1.) oder nur um 0,1 mm (1,0 mm und 1,1 mm bei Tier 12, Geschwür 2.2.). Meist liegen die Werte dicht beieinander. In einigen Proben lässt die lebende epidermale Matrix einen wulstartigen oder wellenförmigen Verlauf bei nahezu gleichbleibender, teils schwankender Dicke über oberflächenwärts gerichteten Ausbeulungen der darunterliegenden Dermis erkennen.

Tabelle 5: Epidermisdicke der auswertbaren Proben: m = Minimalwert, M = Maximalwert. Angaben in [mm]

Tier / Probe	Geschwür 3	Geschwür 4	Geschwür 1.1.	Geschwür 2.2.
Tier 8	-	-	m 0,9; M 1,1	m 1,2; M 1,4
Tier 10	m 1,1; M 1,3	m 1,0; M 1,5	m 1,5; M 1,7	m 0,9; M 1,1
Tier 11	m 1,1; M 1,3	m 0,8; M 1,0	m 1,2; M 2,4	m 1,0; M 1,2
Tier 12	m 1,4; M 1,6	m 1,0; M 1,3	m 1,4; M 2,0	m 1,0; M 1,1
Tier 13	m -	m 1,2; M 1,4	m 1,4; M 1,6	m 1,0; M 1,3
Tier 14	m 1,8; M 2,5	m 1,2; M 1,4	m 1,3; M 2,6	-
Tier 15	m 1,9; M 2,1	m 1,1; M 1,3	m 1,2; M 1,8	m 0,8; M 1,5
Tier 16	m 0,7; M 1,0	m 0,7; M 0,9	m 0,8; M 1,4	m 0,8; M 1,7
Tier 17	m 1,5; M 1,9	m 1,6; M 2,0	m 2,1; M 2,3	m 1,3; M 2,2
Tier 18	m 0,9; M 1,1	m 1,0; M 1,3	-	m 0,9; M 1,3
Tier 19	-	-	m 1,4; M 1,9	m 1,2; M 1,5
Tier 20	m 1,1; M 1,5	-	m 1,1; M 1,3	m 1,0; M 1,5
Tier 21	m 1,5; M 1,7	m 1,2; M 1,7	m 1,3; M 1,6	m 1,1; M 1,9
Tier 22	m 1,4; M 1,6	m 1,2; M 1,4	m 1,6; M 2,2	m 1,0; M 1,1
Tier 23	m 1,4; M 1,7	m 0,8; M 1,4	m 1,0; M 1,8	m 0,9; M 1,5
Tier 24	m 1,3; M 1,7	m 0,9; M 1,2	m 1,1; M 2,9	m 0,9; M 1,1
Tier 25	m 0,9; M 2,8	m 0,9; M 1,2	m 1,0; M 3,7	m 1,1; M 1,3
Tier 27	m 1,2; M 2,5	m 0,9; M 1,5	m 4,1; M 1,3	m 0,9; M 1,3

In der Wundperipherie der Geschwüre liegt über dem Papillarkörper eine Schicht Basalzellen, in die Fremdzellen eingewandert sind. Bei diesen Fremdzellen handelt es sich im Wesentlichen um Granulozyten und kleine Lymphozyten. Melanozyten und deren Zytoplasmaausläufer sowie einige Merkel-Zellen treten in der Reihe der interpapillären Basalzellen auf (Abb. 15f). Die Melanozyten senden ihre Fortsätze in die Interzellularspalten der Spinosazellschicht und die Melanosomen der Melano-

zyten werden an die unteren Epidermiszellschichten abgegeben. Auch in Proben, die aus demselben Areal stammen, wo 30 bzw. 50 Tage zuvor Biopsien bis aus der Lederhaut entnommen wurden, sind Melanozyten und melaninbeladene Keratinozyten vorhanden (Abb. 15e). Die zahlreichen Mitosefiguren - bis zu acht auf einer Fläche von 1 mm² (Tier 19, Geschwürprobe 2.2.) - beschränken sich fast ausschließlich auf den interpapillären und unteren peripapillären Bereich. Die unteren Spinosazellschichten zeigen ebenfalls Mitosen. In manchen Proben sind in der Basal- und unteren Spinosazellschicht sehr viele kleine Epidermiszellen zu finden. In den Maschen zwischen den Keratinfilamenten der Basalzellen liegen Ribosomen, weite, leere Schläuche des rauhen endoplasmatischen Retikulums oder Vesikel des Golgi-Apparates und runde Einschlüsse mit amorphem bis feinkörnigem Material mittlerer Elektronendichte. In den Proben von etwa der Hälfte der Tiere sind in den suprapapillären und oberen peripapillären Basalzellen perinukleär regelmäßig massenhaft äußere Membranen von Mitochondrien anzutreffen, denen die inneren Cristaemembranen verlorengegangen sind.

Die Interzellularspalten zwischen den Basalzellen sind sehr weit und stellen sich lichtmikroskopisch hell sowie transmissionselektronenoptisch leer dar. Über Desmosomen an langen schmalen Zytoplasmaausläufern sind die Basalzellen im Interzellularspalt miteinander verknüpft. Zwischen manchen Basalzellen sind sämtliche Zellkontakte gelöst und der Interzellularspalt ist stark erweitert (Abb. 15c).

Die Zellen des Stratum spinosum zeigen in der Wundperipherie zum Teil massenhaft Melaningranula. Manche Melanozyten reichen mit ihrem Zellkörper weit in das Stratum spinosum hinein. Die kernnahen Ansammlungen von cristae Armen Mitochondrien in den Basalzellen setzen sich in den Spinosazellen noch über einige Lagen fort. Keratinfilamente sind zuerst in Form der Keratinfilamentbündel zwischen den Zellkontakten vorhanden, dann nehmen die Keratinfilamente intrazellulär bis zur Verhornungsgrenze kontinuierlich zu. Zunächst verlaufen sie noch ungeordnet, später vermehrt längs, quer und ausscherend, so dass sie ein Netz mit wabenartiger Kammerung bilden. In den Maschen liegen mehr oder weniger Zellorganellen, v.a. Kernreste, Ribosomen und feinkörniges Material mittlerer Elektronendichte. In oberen Schichten sind die Maschen teilweise leer oder nur wenig gefüllt und verleihen den Zellen ein spongiöses Aussehen. Die Zellkerne einiger oberer Spinosazellen nehmen gefurchte, eingeschnürte oder lange abgeplattete Formen an. Von manchen Kernen ist der perinukleäre Spalt blasig erweitert. Die

Keratinfilamentbündel orientieren sich unter der Verhornungsgrenze in den meisten Fällen parallel zur Oberfläche. In anderen Fällen kommt es nicht dazu. Dort behalten sie ihre netzförmige Anordnung bei. In manchen Bereichen ist die Keratinsynthese gestört. Ihre Syntheserate ist unregelmäßig, denn helle keratinfilamentarme Zellen liegen im oberen Stratum spinosum auf gleicher Höhe mit dunklen keratinfilamentreicheren Zellen.

Der Interzellularspalt ist in den unteren Lagen des Stratum spinosum sehr weit und entweder optisch leer oder locker mit Exsudat oder - meist den gesamten Interzellularspalt ausfüllenden - Interzellularkitt gefüllt. Zum Teil liegt der Interzellularkitt, der noch von einer einschichtigen Membran umgeben ist, in Form von membrane coating granules (MCGs) im Interzellularspalt. Nach Auflösung der einschichtigen Membran verteilt sich das Material gleichmäßig im Interzellularspalt. In oberen Spinosazellschichten ist eine Zunahme von Interzellularkitt zu verzeichnen. Zahlreiche Desmosomen besorgen den interzellulären adhäsiven Kontakt. Annular gap junctions umschließen kleine abgegrenzte Zytoplasmaareale. Fremdzellen werden, wie schon im Stratum basale, auch im Stratum spinosum vorgefunden.

In zwei Dritteln der Proben aus der Wundperipherie der Geschwürshälfte, die in Richtung proximalem Weichballen liegen, ist ein Stratum granulosum ausgebildet. Dabei beschränkt sich die Ausprägung des Stratum granulosum bei den meisten Proben (40 %) auf vereinzelte Zellen unterhalb der Verhornungsgrenze mit wenigen kleinen Keratohyalin granula. Bei nur einem Zehntel der Präparate ist diese Zellschicht mit zahlreichen Granulosazellen deutlich. Bei weiteren 13 % sind die Keratohyalin granula auf die suprapapillären Epidermiszellen konzentriert. Andererseits ist in einigen Proben, deren Entnahmestelle zum Hartballen gerichtet ist, eine deutliche Granulosazellschicht nachzuweisen. Bei transmissionselektronenmikroskopischer Betrachtung sind die Keratohyalin granula unregelmäßig-schollig und erhalten unter der Verhornungsgrenze eine aufgelockert wabige bis spongiöse Struktur.

Zwischen den Granulosazellen und den jungen Hornzellen kommen gelegentlich einzelne helle, rundliche Übergangszellen mit zentral gelegenem karyolytischem Kernrest vor. Beim Fehlen der Übergangszellen erfolgt ein abrupter Sprung der Keratinfilamentorganisation und zwar von den oberen Spinosazellen mit einzelnen Keratinfilamentbündeln zu den jungen Hornzellen mit nahezu homogenen Hornmassen. Desmosomenreste bleiben auch zwischen diesen Zellen erhalten.

6.3 Befunde in der verhornten Epidermis

6.3.1 Die verhornte Epidermis im Wundzentrum am Tag 50

Im Zwischenröhrchenhorn sind die jungen mit leicht marmorierten Hornmassen gefüllten Hornzellen überwiegend abgeflacht. In wenigen Proben hat der tiefe Bereich der Hornschicht eine löchrige Beschaffenheit. Dabei haben die Löcher die halbe bis doppelte Hornzellgröße. Die Löcher sind teils optisch leer, teils mit Exsudat gefüllt. Zellkernreste persistieren maximal über drei bis fünf Hornzellschichten. In abgegrenzten Arealen ist eine Persistenz von Keratohyalin granula bis in oberflächliche Lagen des Stratum corneum zu verzeichnen. Manche Zellen beinhalten kleine Fetttropfen im Zelleib.

Der Interzellularspalt ist in den tiefen Hornzellschichten noch weit und hell. Zwischen übereinander liegenden Zellen ist er stellenweise flach, spindelförmig aufgerissen und optisch leer. Ansonsten sind die Interzellularspalten gleichmäßig weit und mit einem dichten, kompakten Interzellular kitt gefüllt, der einen gleichmäßigen Zellzusammenhalt gewährt.

Bezogen auf gesundes Horn sind die Hornröhrchen schlank. Sie verlaufen im Winkel von etwa 45° zur linearen Verhornungsgrenze schräg in Richtung Oberfläche. Die Markzellen der Hornröhrchen haben einen geringen Gehalt an Keratinfilamenten. Nach ihrem Zerfall in Kernfragmente, Organellenreste und Fetttropfchen durchmischt sich das daraus entstehende Konglomerat mit dem Interzellular kitt und füllt den Markraum der Hornröhrchen partiell aus.

6.3.2 Die verhornte Epidermis in der Wundperipherie am Tag 50

Im Zwischenröhrchenhorn sind die Hornzellen der Wundperipherie vollständig mit leicht marmorierten Hornmassen mittlerer bis starker Elektronendichte gefüllt. Selten kann eine Persistenz von Zellkernresten über 35 Lagen festgestellt werden. Keratohyalin granula persistieren ebenfalls in den tiefen Hornschichten, fehlen dann in den Intermediärschichten und tauchen in oberflächlicheren Schichten wieder auf.

Der Interzellularspalt zwischen den tiefen Lagen ist zunächst weit. In oberflächlicheren Bereichen ist der Interzellularspalt zwischen den Desmosomen fast zu ovaler bis runder Anschnittsfläche ausgeweitet und mit einem Interzellular kitt gefüllt, der nahezu die gleiche Elektronendichte wie die intrazellulären Hornmassen besitzt. Dabei liegt der Interzellular kitt meist zentral im Interzellularspalt und der schmale Raum

zwischen Interzellularkitt und Zelloberfläche ist optisch leer. An den Zellflanken nimmt er einen ausgeprägten mäanderförmigen Verlauf an. Desmosomenreste sind zahlreich erhalten. Stellenweise ist das Stratum corneum durch spindelförmige Hornspalten unterbrochen, die mit Erythrozytenaggregaten gefüllt sind (Abb. 13f). Bereichsweise sind die Hornzellen und der Interzellularkitt zu einer homogenen Masse verschmolzen. Abschnittsweise sind blasenförmig geweitete Interzellularspalten entweder vollständig oder nur partiell gefüllt, wobei die Peripherie optisch leer bleibt. Ein marginales Band ist an der Innenseite der Zellmembran zur Verstärkung der cornified cell envelope mancher junger Hornzellen angelagert.

Das Röhrchenhorn besteht teilweise aus zusammengebackenen, homogenen Hornmassen, die lückenlos und dicht übereinander angeordnet sind. Der Inhalt der tiefen, dicht gepackten Hornröhrchenhornzellen ist gelegentlich spongiös aufgelockert. Das Zellmaterial verdichtet sich jedoch rasch und nimmt dann eine kompakte Beschaffenheit an. Meist besteht die Hornröhrchensubstanz aus einem Gemisch aus homogenen dichten Massen und dazwischen zusammengeballten, unterschiedlich elektronendichten Zellresten. Die unterschiedlichen Materialien sind häufig durch feine Schlitze voneinander getrennt. Oberflächenwärts vergrößert sich das Volumen, ohne allerdings an Färbeintensität einzubüßen. Die homogenen Substanzen konfluieren zunehmend, ordnen sich an der Röhrchenperipherie an und lassen das unterschiedlich elektronendichte Material der Zellreste im Röhrchenzentrum liegen.

6.3.3 Elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn am Tag 50

In Tabelle 6 sind neben den Proben vom Tag 50 (G3, bzw. G4) auch die Bandenmuster der Kontrollproben vom Tag 0 (T8 K1, T11 K1, T21 K1) aufgeführt, die als Referenzproben für "gesundes" Horn herangezogen werden.

Die Bandenstruktur der Proben am Tag 50 gleicht denen vom Tag 0 und Tag 20 bis auf geringe graduelle Unterschiede.

Da sich die Proteinbanden in allen untersuchten Proben an den drei Probenahmeterminen nicht unterschieden, wurde auf eine weitere Spezifizierung der Proteine mittels Immunoblot verzichtet.

Tabelle 6: Übersicht über die aufgetrennten Zellproteine in Hornproben von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren am Tag 50 der Heilung (Darstellung gleicht Tabelle 3, Kap. D.1.3.3)

Probe	T8 G3	T8 K1	T11G3	T11K1	T21G4	T21K1	T22G3	T22G4
Biotin	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja
43 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
45-50 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
54 kd	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
56-58 kd	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████	██████
63 kd	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
67 kd	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
69 kd	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
>93 kd	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====

Textabbildung 5: Bandenstruktur am Beispiel des Proteinextraktes von Tier 21, die für den Tag 50 repräsentativ ist



Wanderungsrichtung der Proteine

7. Biotinbedingte strukturelle Unterschiede im Ablauf der Wundheilung

Da am Tag 0 mit der Biotinsupplementation begonnen wurde, lagen die Plasmabiotinwerte der Tiere, die für die Biotingruppe bestimmt waren, zwischen minimal 310 ng/l und maximal 970 ng/l Plasma. Die Plasmabiotinwerte der Tiere, die der Kontrollgruppe zugeordnet waren, lagen bei minimal 420 ng/l und maximal 730 ng/l Blutplasma. Die einzelnen Plasmabiotinwerte sind der Arbeit von *Koller (1998)* zu entnehmen.

Licht- und transmissionselektronenmikroskopisch wurden zwischen den Biopaten der Tiere der Biotingruppe und der Tiere der Kontrollgruppe vom Tag 0 weder in der Dermis, noch in der Epidermis eklatante strukturelle Unterschiede gefunden. Die

elektrophoretische Bestimmung der Zellproteine im Horn ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Am Tag 20 lagen die Plasmabiotinwerte der Tiere, die seit 20 Tagen eine Biotin-supplementation erhalten haben, zwischen 2300 und 6700 ng/l Blutplasma. Im Gegensatz dazu sind die Werte bei den Kontrolltieren weiterhin niedrig und liegen zwischen 340 und 1010 ng/l Blutplasma.

Morphologisch histologisch zeichnet sich am Tag 20 bei den Biotintieren ein vermehrtes Auftreten von zahlreichen degenerierten Mitochondrien ab. Diese Mitochondrien liegen besonders perinukleär in den mittleren bis oberen peripapillären und suprapapillären Basal- und Spinosazellen. Die degenerativen Veränderungen spiegeln sich im Verlust der inneren Cristaemembranen wieder. Während diese Form der Mitochondrien in den Proben der Biotintiere regelmäßig auftritt, ist sie in den Kontrolltieren zwar auch vorhanden, aber nicht die Regel, also sind hier lediglich graduelle Unterschiede zu verzeichnen. Weitere Unterschiede zu den Kontrolltieren konnten in dieser Untersuchung nicht beobachtet werden.

Am Tag 50 ergaben die Plasmabiotinwerte der Biotintiere Werte zwischen 1870 und 7550 ng/l und die der Kontrolltiere Werte zwischen 360 und 960 ng/l und einem Ausreißer mit 2100 ng/l.

Auch an diesem Tag ist der einzige Unterschied zwischen Biotin- und Kontrolltieren im Vorhandensein der oben beschriebenen Mitochondrien in Basal- und Spinosazellen zu finden. Bei den Biotintieren kommen cristaearme Mitochondrien am Tag 50 auch schon in den unteren interpapillären Basalzellen vor.

8. Statistik: Entwicklung der histologischen Qualität im Verlauf der Wundheilung unter Biotineinfluß

In den Tabellen 7a und 7b sind die Einzelnoten der drei strukturellen Qualitätsfaktoren der Tiere (auch der, die nicht vollständig zu bewerten waren) zu den drei Terminen (T0, T20, T50a und T50b) beider Gruppen (Biotingruppe und Kontrollgruppe) zusammengestellt, die sich nach der Bewertung durch die beiden unabhängigen Untersucher ergeben haben. Das Stratum spinosum (Ss) ist jeweils getrennt vom Stratum corneum (Sc) aufgeführt. Die obere Zahl gibt die Bewertung für die intrazellulären Faktoren (QF1) an, der mittlere Wert spiegelt die Bewertung der interzellulären Faktoren (QF2) und der untere Wert die Architektur des Zellverbandes (QF3)

wider. Gruppe 1 vereinigt die Tiere der Biotingruppe und Gruppe 2 die Tiere der Kontrollgruppe. Vom dritten Termin am Tag 50 liegen jeweils zwei Benotungen vor: T50a und T50b.

Tabelle 7a: Einzelnoten aus der histologischen Bewertung der strukturellen Qualitätsfaktoren der Tiere der Biotingruppe

Gruppe	Tier	QF	SsT0	ScT0	SsT20	ScT20	SsT50a	ScT50a	SsT50b	ScT50b
1	4	1	0	2	1	0,5	0,5	1	1	0,5
1	4	2	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0
1	4	3	0	1	1,5	2	1	1	1	0
1	6	1		0,5	0,5	0,5	3	0,5	0,5	0,5
1	6	2		0,5	0	1	1	1	0	0,5
1	6	3		1	5	0	1	0	0,5	0
1	10	1	0,5	1	0,5	1	1	1,5	3	0,5
1	10	2	0	1	0	0	0,5	0,5	1	0
1	10	3	0,5	0	1	0,5	2	1,5	1,5	0
1	12	1	1	0,5		0,5	0,5	1	1	1,25
1	12	2	0	0,5		1	0,5	0,5	0	0,5
1	12	3	1	0		1	0,5	0	0,5	0
1	15	1		3	2	1	1,5	1,5	3	1,5
1	15	2		3	2,5	0,5	0,5	2	1,5	2
1	15	3		1	1	0,5	1	0,5	2	0,5
1	16	1	2	1,75	1	1,5	1,5	2	2	2
1	16	2	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	1
1	16	3	1	1	1	0,5	1	0,5	1	1
1	17	1	2,5	1,5	1	1,5	1,75	1,5	2	1
1	17	2	1	0,5	0,5	1	0	0,5	1	1
1	17	3	2	1	1	0,5	1	1,5	1	1
1	18	1	3	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
1	18	2	1	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0	0,5
1	18	3	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5
1	21	1	0,75	1	3	2	1	1,5	1	1,5
1	21	2	0	0,5	2,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5
1	21	3	0,5	0,5	3	2	1,5	1,5	0,5	0,5
1	25	1	1,5	2	1,5	1,5	2	2	1	2
1	25	2	0	0	1	1	0	1	0	1
1	25	3	1	1	1	0,5	1,5	1	1,5	1
1	27	1	1	1,5	0,5	1,5	0,5	0,5	1	1
1	27	2	0	0,5	0	0,5	0	1	0	0,5
1	27	3	0,5	1	0,5	0	1	0,5	1	0

Von den Tieren Nr. 1, 2, 3 und 22 liegen keine Ergebnisse vor.

Tabelle 7b: Einzelnoten aus der histologischen Bewertung der strukturellen Qualitätsfaktoren der Tiere der Kontrollgruppe

Gruppe	Tier	QF	SsT0	ScT0	SsT20	ScT20	SsT50a	ScT50a	SsT50b	ScT50b
2	5	1	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5	1	1,5	1,5
2	5	2	0,5	0	0	0	1	0,5	1,5	0,5
2	5	3	0,5	0	1	1	1	0	1	0,5
2	7	1	0,5	1	0	1,5	0,5	1	1	2
2	7	2	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2	7	3	0,5	1	0	0	0	0	1	1
2	8	1	1	0	0	1,5	2,5	1	3	0,5
2	8	2	0,5	0	0	0	0,5	0,5	1,5	1
2	8	3	1	0,5	1	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5
2	9	1	0	0,5	1	2	1	1,5	1	0
2	9	2	0	0,5	0,5	1	0,5	1,5	0	0
2	9	3	1	0	0,5	0	0	0	0	0
2	11	1	1	1		2	2,5	1	0,5	1
2	11	2	0	0		2	1	0,5	0	0,5
2	11	3	1	0		2	1,5	1	1	0,5
2	13	1	0,5	1	0,5	1,5	1	1,5		
2	13	2	0	0,5	0	0	0	0,5		
2	13	3	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5		
2	14	1	1	2	1	1	1	1,5	0,5	1
2	14	2	0	0,5	0	1	0	0,5	0	0
2	14	3	0	0	1	0,5	0	0	0,5	0
2	19	1	1,5	1,5	1	1	3	1	0,5	0,5
2	19	2	0,5	0,5	1	1	1	1	0	0
2	19	3	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	2	0	0
2	20	1	3	1,5	1,5	1,5			1,5	1,5
2	20	2	1	0,5	0	0,5			0	0,5
2	20	3	1	1	1,5	1			0,5	1
2	23	1	3	2	1,5	2	0,5	2	0,5	1,5
2	23	2	2	1	0,5	0,5	0	0,75	0	1
2	23	3	2	1	1	1	0,5	0,75	0,5	1
2	24	1	1	1	3	1,5	0,5	1	1,5	1
2	24	2	0	0,5	1,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
2	24	3	0,5	0	1,5	1	0,5	1	1	1
2	26	1	1	1,5	2	1	1	1	1	1
2	26	2	0	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5
2	26	3	0,5	0	0,5	1,5	0,5	1	0,5	0,5

Für den Gruppenvergleich wurden nur die Tiere herangezogen, die zum Zeitpunkt Tag 0 und zum Zeitpunkt Tag 50 vollständig zu bewerten waren. Dadurch entfallen die Tiere Nr. 6, 13, 15 und 20.

Die Tabelle 8 enthält die "Scores" für die einzelnen Tage und als Kenngröße für den Heilungserfolg die Differenzen der Benotung am Tag 50 zu Tag 0 (ÄND50-0).

Tabelle 8: "Scores"/ Summenwerte (ST0, ST20, ST50A, ST50B) der Tiere zu den drei Zeitpunkten, Differenzen zwischen Summe T50a und Summe T50b (DIFST50), Mittelwerte aus Summe T50a und Summe T50b (MST50) und Differenzen zwischen Mittelwert T50 und Summe T0 (ÄND50-0)

Gruppe	Tier	ST0	ST20	ST50A	ST50B	DIFST50	MST50	ÄND50-0
1	4	3,00	5,50	4,00	2,50	-1,50	3,25	,25
1	10	3,00	3,00	7,00	6,00	-1,00	6,50	3,50
1	12	3,00		3,00	3,25	,25	3,13	,13
1	16	6,25	4,50	5,50	7,00	1,50	6,25	,00
1	17	8,50	5,50	6,25	7,00	,75	6,63	-1,88
1	18	7,50	4,50	6,00	4,50	-1,50	5,25	-2,25
1	21	3,25	14,50	6,50	4,50	-2,00	5,50	2,25
1	25	5,50	6,50	7,50	6,50	-1,00	7,00	1,50
1	27	4,50	3,00	3,50	3,50	,00	3,50	-1,00
2	5	2,00	4,00	5,00	6,50	1,50	5,75	3,75
2	7	3,50	2,00	2,50	6,00	3,50	4,25	,75
2	8	3,00	3,00	6,50	8,00	1,50	7,25	4,25
2	9	2,00	5,00	4,50	1,00	-3,50	2,75	,75
2	11	3,00		7,50	3,50	-4,00	5,50	2,50
2	14	3,50	4,50	3,00	2,00	-1,00	2,50	-1,00
2	19	5,00	5,00	9,50	1,00	-8,50	5,25	,25
2	23	11,00	6,50	4,50	4,50	,00	4,50	-6,50
2	24	3,00	9,00	4,00	5,00	1,00	4,50	1,50
2	26	3,50	6,00	4,00	3,50	-,50	3,75	,25

Im folgenden qualitativen Vergleich wird die strukturelle Qualität der beurteilten epidermalen Schichten eines Tieres als verbessert bzw. verschlechtert angesehen, wenn sich die Notensumme am Tag 50 gegenüber dem ersten Termin am Tag 0 um mindestens eine ganze Note geändert hat.

Aus der Tabelle 8 ist ersichtlich, dass in der Biotingruppe (Gruppe 1) ohne Berücksichtigung der Zwischennote vom Tag 20 bei drei Tieren eine Verbesserung der strukturellen Qualität nach 50 Tagen festgestellt werden konnte (negative Zahlenwerte), bei drei Tieren gab es keine bzw. nur im Bereich bis zu einer viertel Note liegende Veränderungen in der Beurteilung der Qualitätsfaktoren. Die restlichen drei Tiere zeigen eine Verschlechterung des histologischen Zustandes der beurteilten epidermalen Schichten.

In der Kontrollgruppe (Gruppe 2) ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier konnte zwar nur bei zwei Tieren eine Besserung festgestellt werden, aber eines der beiden Tiere (Nr. 23) erreichte mit Abstand das beste Ergebnis. Andererseits ist in dieser Gruppe auch das Tier mit der schlechtesten Entwicklung der Qualitätsfaktoren vertreten (Tier Nr. 8). Bei weiteren drei Tieren hat sich das Bild ebenfalls verschlechtert. Keine bzw. nur im Bereich von bis zu einer dreiviertel Note liegende Veränderungen gab es in dieser Gruppe bei vier Tieren.

Außerdem wurden die letztgenannten Änderungswerte in einer explorativen (deskriptiven) Datenanalyse mittels U-Test verglichen. Die Quartile der Differenzen zwischen den "Scores"/ Summenwerten von T50 und T0 sind in Tabelle 9 und ihre Ergebnisse nach Gruppen getrennt in Form von Box-Plots (Textabbildung 6) dargestellt.

Textabbildung 6: Entwicklung der strukturellen Qualität vom Tag 0 bis Tag 50. Differenzen der "Scores" (Notensummen). Wegen $ST_{50} - ST_0$ sind tiefer liegende Punkte günstiger zu bewerten.

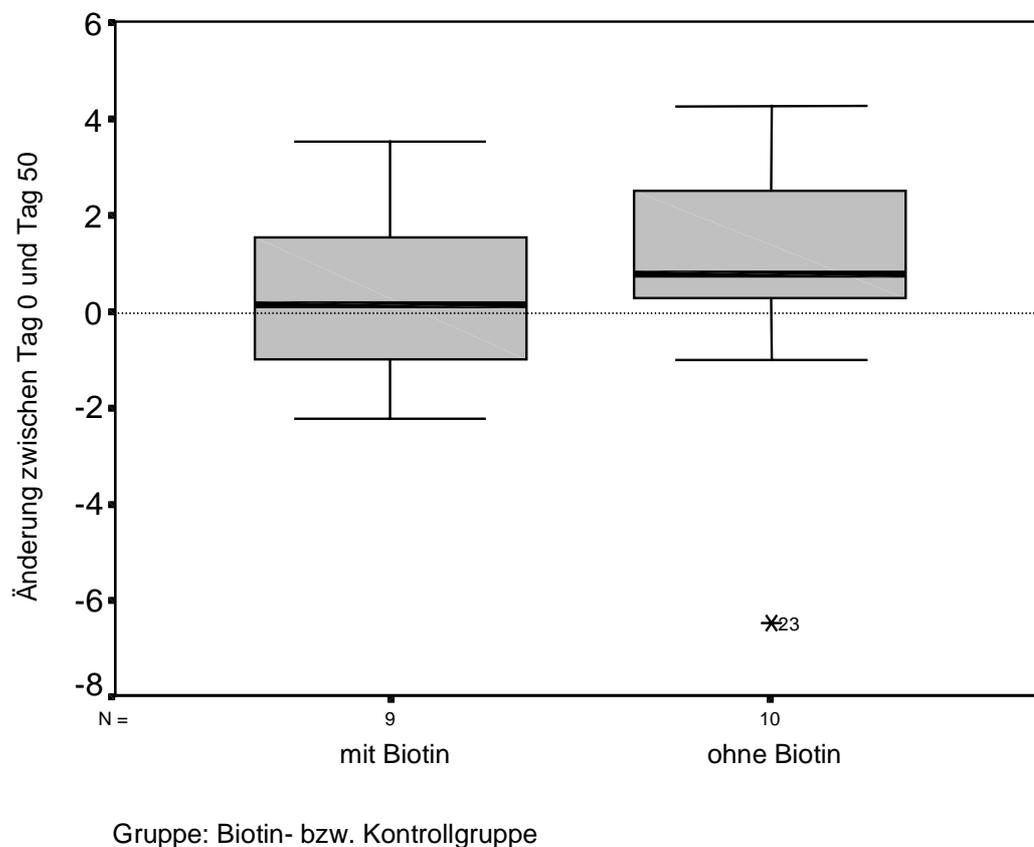


Tabelle 9: Perzentile von der Änderung der Notensummen (ST50 - ST0)

		Perzentile						
		Quartile					90	95
		5	10	25	50	75		
Gewichtetes Mittel Änderung T50-T0	mit Biotin	-2,25	-2,25	-1,437	0,125	1,875	.	.
	ohne Biotin	-6,5	-5,95	-0,0625	0,75	2,8125	4,2	.
Tukey-Angelpunkte Änderung T50-T0	mit Biotin			-1,00	0,125	1,50		
	ohne Biotin			0,25	0,75	2,50		

Mit den Boxplots in der Textabbildung 6 werden die Ergebnisse der Biotingruppe und der Kontrollgruppe bezüglich des Heilungserfolges nebeneinander dargestellt und verglichen. Dazu wurden die Differenzen der Notensummen ("Scores") vom Tag 0 und Tag 50 gebildet. Für eine gute Qualität wurde ein niedriger "Score" und für eine schlechtere Qualität wurde ein höherer "Score" vergeben (s. Kap. C.2.4.1). Ausgehend von einer schlechten Qualität mit einem hohen "Score" am Tag 0 (ST0) und einer guten Qualität mit einem niedrigen "Score" am Tag 50 (ST50) ergibt sich bei einem optimalen Heilungsverlauf (ST50 - ST0) ein negativer Wert, z.B. Tier 23.

Der Median der Biotingruppe liegt mit 0,125 auf einem niedrigeren Niveau als der Median der Kontrollgruppe (0,75). Bei den Kontrolltieren liegt der Median außerdem nicht in der Mitte der 50%-Box. Es liegt eine schiefe Verteilung vor. Die Grenzen der Box sind die Tukey-Angelpunkte (Tabelle 9). Danach liegen die Ergebnisse bei 50 % der Biotintiere zwischen -1,00 und 1,50 und bei 50 % der Kontrolltiere zwischen 0,25 und 2,50. Das Ergebnis vom Tier Nummer 23 ist als Extremwert unter den Kontrolltieren mit einem Stern bei -6,5 gekennzeichnet. Auch die größten und kleinsten Beobachtungswerte liegen in der Biotingruppe jeweils auf einem niedrigerem Niveau als die Werte der Kontrollgruppe. Die Niveauunterschiede zwischen den Gruppen sind gering und außerdem überschneiden sich die Box-Plots.

Einzeltiere zeigen deutliche Unterschiede.

Die weitere statistische Auswertung (U-Test) hat jedoch ergeben, dass es im Gruppenvergleich keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Entwicklung der strukturellen Qualität gibt, weil die Ergebnisse der einzelnen Tiere innerhalb der Gruppen sehr stark streuen und weil zum Gruppenvergleich alle zugehörigen Tiere der Gruppe zu berücksichtigen sind.

In beiden Fällen (qualitative Betrachtung und U-Test) ist statistisch also kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar.