

## E. DISKUSSION

Für die Darstellung der Heilung von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren (und ihrer Beeinflussung durch Biotinsupplementation) wurden licht- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungstechniken in Kombination mit der Gelelektrophorese als analytische Methode angewendet. Sie sollen eine Beschreibung und Einteilung von Stadien der Wundheilung in der Rinderklaue ermöglichen, wie sie bereits seit langem für Wunden in der äußeren behaarten Haut existieren. Mit den eingehenden Untersuchungen über die normale Feinstruktur der gesunden Rinderklaue an diesem und anderen Instituten (*Bragulla und Mülling, 1992; Budras und Mülling, 1994; Budras et al., 1997a; Dirks, 1985; Fürst, 1992; Mülling, 1993; Warzecha, 1993*) wurde die Grundlage für die vorliegende Untersuchung geschaffen. In der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Wundheilung im starren, von der äußeren Haut stark modifizierten Klauengewebe mit der Vielzahl und Komplexität der angewandten, verfeinerten Methoden erstmalig erfolgt. Ein direkter Vergleich mit den Erkenntnissen in der Literatur über die Wundheilung an der äußeren Haut, über die pathologische Struktur der Klaue und über klinische Untersuchungen zur Heilung von Klauengeschwüren ist erschwert. Sehr wohl sind Vergleiche im Verlauf der Wundheilung an der äußeren Haut anzustellen. Dabei müssen jedoch die Besonderheiten an der Klaue im Vergleich mit der Haut beachtet werden. Die Ergebnisse beruhen auf vergleichenden Untersuchungen der Wundheilung an der Klaue und sind daher geeignet, neue Aspekte in die Diskussion über das Krankheitsgeschehen des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs einzubringen.

Aus der großen Zahl der untersuchten Einzelbefunde kristallisieren sich nach Sichtung, Beschreibung, Vergleich und gezielter Auswahl die Kernereignisse heraus, anhand derer die Diskussion unter folgenden Schwerpunkten gegliedert wird:

1. Methodik
2. Mikrozirkulation und Integrität des dermalen Bindegewebes
3. Veränderungen am dermoepidermalen Grenzbereich
4. Intrazelluläre strukturelle Veränderungen in der Epidermis
5. Veränderungen der epidermalen Interzellularspalten
6. Unterschiede zur Wundheilung in der äußeren Haut
7. Wirkung einer Biotinsupplementation auf den Heilungsverlauf.

Diese Punkte sollen übergreifend insbesondere im Hinblick auf die Qualität der Heilung diskutiert werden.

Jede Verletzung durch Erkrankungen an der Klaue muss schnell und möglichst vollständig geheilt werden, weil eine gute Klauengesundheit für das Wohlbefinden und die Leistungsfähigkeit der Tiere unerlässlich ist. Besonders das Gefäßsystem der Lederhaut, das bei der Entstehung von RUSTERHOLZschen Geschwüren in Mitleidenschaft gezogen wird, muss funktionell vollwertig wiederhergestellt werden, um die nutritive Funktion zur Differenzierung und Integrität der avaskulären Epidermis zu sichern (*Hirschberg et al., 1999*).

### 1. **Methodik**

Zur Gewinnung der Proben wurden ausgewählte Tiere mit einem unkomplizierten, meist leichtgradigen RUSTERHOLZschen Klauengeschwür an einer lateralen Hinterklaue für den Untersuchungszeitraum von 50 Tagen unter standardisierten und kontrollierten **Bedingungen** gehalten. Diese Haltungsbedingungen haben den Vorteil, dass die äußeren Verhältnisse nahezu konstant sind und für alle Tiere die gleichen Grundvoraussetzungen gegeben sind (*Koller, 1998*). Unter Stallbedingungen verlief die Heilung sicherlich anders, da gehäuft Komplikationen mit Infektionsfolgen zu erwarten sind. Inwieweit die regelmäßige Biopsieentnahme während der Wundheilung das Wundheilungsgeschehen stört, weil damit immer wieder ein neuer Defekt gesetzt wird, kann nicht genau bestimmt werden, darf aber bei der Bewertung der Ergebnisse in keinem Fall außer Acht gelassen werden.

Bezüglich des **Rhythmus** der Probenentnahme ist zwischen dem wissenschaftlichen Interesse zur Datenerfassung und den Erfordernissen des Tierschutzes abzuwägen. Die kontrollierte Studie mit Verbandswechsel im 5-tägigen Rhythmus und Biopsieentnahme am Tag 0, 20 und 50 ist mit einer normalen Wundheilung von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren, wie sie in der Landpraxis versorgt werden, nur bedingt vergleichbar. Nichtsdestoweniger ermöglicht sie die Beschreibung der prinzipiellen Ereignisse der Wundheilung in ihrem zeitlichen Ablauf. Darüber hinaus bietet eine genaue Entnahme und unmittelbare Fixation der Proben für die vorliegende Untersuchung den Vorteil, dass ultrastrukturelle Veränderungen während des Heilungsverlaufes erfassbar sind.

Kürzere Intervalle bei der Probenentnahme wurden aus Gründen des Tierschutzes nur an einem Tier gewählt. Die Probenentnahme erwies sich zudem als Beeinträchtigung der Wundheilung. Aus wissenschaftlicher Sicht erschienen die kürzeren Abstände sinnvoll, da für die Wundheilung an der äußeren Haut bekannt ist, dass die grundlegenden Vorgänge der Wundheilung hier nach etwa 10 bis 14 Tagen abgeschlossen sind (*Banks, 1993; Bertone, 1989; Waldorf und Fewkes, 1995*). Allen anderen Tieren wurde aus Tierschutzerwägungen zwischen den Biopsieentnahmen eine längere Pause gewährt.

Für die strukturellen Untersuchungen im Verlauf der Wundheilung der RUSTERHOLZschen Klauengeschwüre wurden **Methoden** ausgewählt, die sich bereits in der Untersuchung gesunder Klauen bewährt haben (*Mülling et al., 1994c*). Lichtmikroskopische Untersuchungen von Biopsien aus RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren wurden schon von *Koller (1998)* durchgeführt. In seiner Studie liegt der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Architektur des Hornzellverbandes und den pathologischen Veränderungen der verhornten Klauenepidermis in Form von Mikrorissen und verdickten Hornröhrchen. Er bedient sich zur Klassifizierung der Ergebnisse eines von ihm selbst definierten Histologienotensystems. In dieser Arbeit wurden während der Untersuchung die subepidermal liegende Dermis und die lebende epidermale Matrix gleichermaßen mit beurteilt, da im Verlauf der Wundheilung gerade in diesen Schichten deutliche strukturelle Veränderungen erwartet wurden. Daher sind die Ergebnisse nur bedingt mit denen von *Koller (1998)* vergleichbar. Die *transmissionselektronenmikroskopische* Untersuchung erwies sich zwar als technisch aufwendige, aber sehr aussagekräftige Untersuchungsmethode zur Beurteilung der intrazellulären Ultrastruktur und der Struktur des Interzellularkittes, die lichtmikroskopisch nicht erfassbar waren. Die Nachteile liegen in der geringen Größe des jeweils untersuchten Gewebeabschnittes, die eine sorgfältige Auswahl des Probenareals, eine ergänzende lichtmikroskopische Untersuchung und genaue Kenntnisse der "normalen" Struktur voraussetzen, um repräsentative Befunde zu erlangen. Die *gelelektrophoretische* Untersuchung wurde durchgeführt, weil sie die Methode der Wahl für die Analyse der Proteinzusammensetzung von Zellen und Geweben darstellt und sich aus der Literatur zahlreiche Hinweise auf mögliche Einflüsse von Wundheilungsprozessen auf die Synthese von Zytokeratinproteinen ergeben (*Sun et al., 1985*). Sie ist nur mit Material durchführbar, das unfixiert und damit nicht denaturiert

ist. Dieses lag in Form der tiefgefrorenen Proben (Kap. C.1.3) vor. Die Proteine aus dem Klauenhorn wurden mit Harnstoff extrahiert, eine Methode, die *Grosenbaugh und Hood (1992)* am Pferdehuf erfolgreich eingesetzt haben und die von *Hochstetter (1998)* für die Untersuchung der Klaue optimiert wurde. Die Extraktion der Proteine aus den Klauenhornproben gelang nicht immer vollständig, denn ein geformtes Restsediment blieb meist ungelöst. Aus der verhornten Epidermis wird nicht immer die gleiche Menge von Proteinen herausgelöst, aber die gewonnenen Ergebnisse sind dennoch qualitativ untereinander vergleichbar, weil sie gleichzeitig auf dem selben Gel getrennt wurden.

## 2. Mikrozirkulation und Integrität des dermalen Bindegewebes

Besonderheiten im Bau der Klaue bieten die Voraussetzungen, dass es im Bereich der Klauenlederhaut häufig zu lokalen Mikrozirkulationsstörungen kommt (*Hirschberg et al., 1999; Morcos, 1960; Nilsson, 1966; Singh et al., 1994*). Aufgrund veränderter Druckverhältnisse (Scherkräfte, Belastung) auf das Gewebe sind die Blutgefäße in den Lederhautpapillen für Störungen in der Mikrozirkulation sehr empfänglich (*Bargai, 1997*). Mikrozirkulationsstörungen spielen daher in der Pathogenese des RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs eine große Rolle. Bei der Entstehung von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren wird die Lederhaut zwischen dem Klauenbein und dem Hornschuh im Ballenbereich gequetscht, papilläre Blutkapillaren werden lädiert und Blut tritt in die Lederhaut aus (*Greenough, 1987*). Dabei kommt das erythrozytäre Extravasat mit den Kollagenfasern der Lederhaut in Berührung (*Desai, 1997*) und initiiert die Hämostase (*Fowler, 1989*). Das Ergebnis ist ein Gerinnsel, das weiteren Blutaustritt verhindert und eine vorläufige Grundsubstanz für die Invasion von Entzündungszellen darstellt (*Clark, 1993b*).

Bei unveränderten Kapillaren im Stratum reticulare liegt am ersten Termin der Probenentnahme besonders in den Papillenspitzen des vorliegenden Untersuchungsgutes eine Thrombosierung oder Dilatation im Kapillargebiet vor, in dem auch Austritte von Blutzellen und Extravasaten zu erkennen sind. Am Tag 50 finden sich nach wie vor Blutgefäße in der Ballenlederhaut, die im Papillenspitzenbereich thrombosiert oder dilatiert und leer sind. Die suprapapilläre Epidermis lässt Gewebeschädigungen erkennen.

Das Gefäßsystem in der Dermis muss eine adäquate Versorgung der sich differenzierenden Epidermiszellen gewährleisten. Nur dann kann eine qualitativ hochwertige

Epidermis gebildet werden. Eine gestörte kapilläre Perfusion durch Thrombosierung oder Dilatation der Kapillaren hat eine unzureichende Versorgung der tributären Gewebereiche zur Folge. Störungen der Mikrozirkulation führen in Übereinstimmung mit *Mülling (1998)* und *Fürst (1992)* zu dyskeratotischen Veränderungen in der Epidermis mit Folgen für die funktionelle Integrität. Im Falle der untersuchten Geschwüre führen die Mikrozirkulationsstörungen durch Thromben letztendlich zu einer schlechten Heilung und hohen Rezidivneigung.

Der genannte Austritt von Blut in das umgebende Bindegewebe erfolgt in dem vorliegendem Untersuchungsmaterial durch Rhexisblutungen. Unklar bleibt dabei jedoch, ob diese Blutungen durch die Biopsieentnahme, wie sie bei *Koller (1998)* beschrieben ist, begünstigt oder gar verursacht wurden. Möglicherweise wurden einige Papillen bei der Manipulation aus der Epidermis gerissen und dabei die papillären Blutgefäße verletzt und eröffnet, so dass Blut austreten konnte. Eine Konzentration von Hämorrhagien auf die Papillenspitzenbereiche beschreiben auch *Boosman et al. (1989)* bei der Klauenrehe im Sohlensegment. Bei der Hufrehe weist *Marks (1984)* Rhexisblutungen im Kronpolster nach, die aufgrund von Quetschungen der Blutgefäße durch den Processus extensorius auftreten, der durch die Hufbeindislokation das Kronpolster komprimiert.

Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Ursachenerkennung der permanenten Thrombosierung der Papillenspitzengefäße und der Eröffnung möglicher Wege, diese auszuschalten, um eine ungestörte Mikrozirkulation zu gewährleisten. Dabei ist auch der Grad der neuen Vaskularisierung zu berücksichtigen. Durch die Ausschaltung hypoxischer Verhältnisse wird die Kollagensynthese aktiviert, bei der Sauerstoff für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin erforderlich ist (*Adzick und Longaker, 1991*).

In der vorliegenden Untersuchung wurde im Bereich des Wundzentrums gegen Ende des Versuches bei einigen Proben eine höhere **Dichte** an kleinen **Blutgefäßen** mit dichtem Besatz von Endothelzellen gefunden als in der Wundperipherie. Die ständige Erneuerung der Zellen erfordert einen intensiven Stoffwechsel, der wiederum eine ausreichende Ausbildung sowie Anordnung der Blutgefäße in der Lederhaut voraussetzt (*Smollich und Michel, 1992*). Eine höhere Dichte an Kapillaren ist auch während der Wundheilung für die nutritive Versorgung der beteiligten Zellen notwendig (*Bondar et al., 1991*). Daher sprossen im Verlauf der Wundheilung zunächst zahlrei-

che Kapillaren in das Wundgebiet und ermöglichen eine fortschreitende Wundheilung. In diesem Aspekt der Blutgefäßneubildung ist die Wundheilung an der modifizierten Haut der Klaue mit der Wundheilung in der äußeren Haut vergleichbar. Der Zeitrahmen dieser Phase weicht bedingt durch die Modifikation der Klauenhaut ab. *Kiritsy et al. (1993)* und *Clark (1993a)* beschreiben im Rahmen der Wundheilung an der äußeren Haut eine Proliferation der im ursprünglichen Gefäß zurückgebliebenen Endothelzellen zur kontinuierlichen Angiogenese. Die von vielen Autoren (*Banks, 1993*) beschriebenen Teilungsfiguren in Endothelzellen konnten in dem vorliegenden Untersuchungsgut allerdings nicht gefunden werden. In der Forschung (Therapie) ist besonderes Augenmerk auf die Ausbildung eines leistungsfähigen Gefäßsystems zu richten. Die beobachteten Befunde deuten auf eine Störung in der Perfusion hin.

Strukturveränderungen des **Bindegewebes** in den Papillenspitzen zeigen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum im Verlust der periodischen Querbänderung und dem Aufspießen der Enden der kollagenen Mikrofibrillen. Fragmentierung, Verquellung und undeutliche Konturierung sind weitere Begleiterscheinungen an den Kollagenmikrofibrillen. Einige Fibroblasten sind ebenfalls degeneriert. Einerseits haben entzündlich bedingte Veränderungen in der Ballenlederhaut während der Entstehung eines RUSTERHOLZschen Klauengeschwürs eine gesteigerte Permeabilität der geschädigten dermalen Blutkapillaren zur Folge (*Cooper, 1990; Witte und Barbul, 1997*). Flüssigkeit mit enthaltenen niedermolekularen Eiweißkörpern wird der Eintritt in die Dermis und sekundär in die Interzellularspalten und Zellen der Epidermis gewährt. Andererseits beeinträchtigt diese subepidermale Exsudation die kollagenen Mikrofibrillen und führt zur Degeneration der Fibroblasten. Der Umsatz des Bindegewebes ist deutlich gestört. Degenerativ hypoxisch geschädigte Fibroblasten sind nicht mehr in der Lage, gesundes Kollagen zu synthetisieren und zu erneuern. Das Bindegewebe ist strukturell verändert, in seiner Festigkeit vermindert und als Diffusionsstrecke beeinträchtigt. Daraus resultiert schließlich auch eine nutritive Dysfunktion der avaskulären Epidermis. Beim Krankheitsverlauf der Hufrehe des Pferdes beschreibt *Marks (1984)* an der dermoepidermalen Grenze eine Linie verminderten Zellzusammenhaltes, wodurch die subepidermale Exsudation eine Auflockerung und Separierung der dermoepidermalen Kontakte und letztendlich eine Hufbeindislokation begünstigt.

### 3. Veränderungen am dermoepidermalen Grenzbereich

Die dargestellten Veränderungen an der gesamten **Basalmembran** sind von großer funktioneller Bedeutung für Ernährung und biomechanischen Zusammenhalt sowie für die Differenzierung der Epidermiszellen. Sie kommen über den gesamten Versuchszeitraum ohne Besserung am Abschlusstermin vor. Diese sind möglicherweise eine Erklärung für die Dyskeratose und mangelnde Differenzierung der Epidermis. Im Gegensatz zu den Angaben von *Marks (1984)*, der bei der Hufrehe des Pferdes ein regelmäßiges Auftreten von Rupturen der Basalmembran beschreibt, ist hier die Kontinuität der Basalmembran nur selten unterbrochen.

Die Basalmembran kontrolliert den Austausch von Nährstoffen und Makromolekülen zwischen Dermis und Epidermis. Epidermales Wachstum und insbesondere die ordnungsgemäße Differenzierung der Epidermiszellen setzt ein intaktes dermoepidermales Gefüge voraus (*Pollitt, 1994*). Unter Exsudateinfluss kann die Barrierefunktion der Basalmembran nicht voll aufrecht erhalten werden. Solange die Basalmembran unterbrochen oder verändert ist, findet keine Regeneration der Epidermis, also keine Heilung statt. Das Eindringen von Entzündungszellen in die Epidermis wird begünstigt. Eine ordnungsgemäße Keratinisierung der Epidermiszellen wird erschwert. Die vollständige Regeneration der Basalmembran nach Zusammenhangstrennungen der menschlichen Haut ist nach Untersuchungen durch *Andriessen et al (1997)* ein langsamer Prozess, der für die epidermalen Veränderungen während der Wundheilung verantwortlich ist. Auch *Pellmann (1995)* beschreibt die oben genannten Veränderungen der Basalmembran und sieht sie als Anzeichen einer starken mechanischen Belastung oder eines krankhaften Zustandes. Die mechanische Belastbarkeit ist überstrapaziert und die nutritive Barriere und Versorgung gestört.

Die Lamina rara interna ist nach *Chan et al. (1993)* lediglich ein Dehydrationsartefakt. Die Lamina densa enthält Kollagen vom Typ IV, das von Glykoproteinen (Laminin) eingewickelt ist (*Pollitt, 1994*). Nach *Briggmann (1982)* sind Verdoppelungen und Unterschiede in der Dicke und Elektronendichte der Lamina densa selbst in der normalen Haut manchmal zu beobachten. Sie werden auf eine permanente Erneuerung der Basalmembran zurückgeführt. *Pollitt (1994)* findet ihre Verdoppelungen ungewöhnlich.

#### 4. Intrazelluläre strukturelle Veränderungen in der Epidermis

##### 4.1 **Epidermale Matrix**

Trotz vergleichbarer Lokalisation, gleichen Ursprungsleidens, gleicher Behandlung, gleicher Haltungsbedingungen und gleicher Grundfütterung sind die noch lebenden Epidermisschichten (epidermale Matrix) der einzelnen Tiere zu jedem Untersuchungszeitpunkt unterschiedlich stark dyskeratotisch (siehe dazu auch Tab. 7a und b, Kap. D.8). Bei einigen Tieren sind fast keine Veränderungen zu sehen, während andere vom selben Probenentnahmeterrain stark pathologisch verändert sind.

Diese sind auf die marginale Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zurückzuführen, die bereits im vorherigen Abschnitt der Mikrozirkulation diskutiert wurde und deren weitere Folgen später erörtert werden. Die Wundheilung an der Fußungsfläche der Klaue ist ein sehr komplexer Vorgang, der von einer kaum zu überschauenden Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Eine Einteilung der Wundheilung in Stadien schien unangebracht, weil deutliche Abweichungen vom entsprechenden Geschehen in der äußeren Haut offensichtlich sind und weiterer Forschungsbedarf besteht (s. Kap. E.6).

Nach den Lahmheits- und klinischen Untersuchungen von *Koller (1998)* ging der Lahmheitsgrad derselben Tiere innerhalb des Untersuchungszeitraumes bis zum letzten Termin insgesamt deutlich zurück. Im vorliegenden Probenmaterial fanden sich demgegenüber insbesondere bei transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchung auch bei Tieren, die klinisch geheilt beurteilt wurden, noch ultrastrukturelle Veränderungen. Diese stellen die Grundlage für eine gesteigerte Disposition für spätere Geschwüre an gleicher Stelle und Rezidive dar. Mit den vorliegenden Untersuchungen können Aussagen getroffen werden, die über eine klinische Beurteilung hinaus gehen. Die Wiederherstellung der Struktur ist die Voraussetzung für ihre uneingeschränkte Funktion. Eine vollständige restitutio ad integrum mit der Wiederherstellung eines normalen, gesunden Zustandes wird aufgrund der ultrastrukturellen Befunde nicht erreicht. Die betroffenen Areale der Klaue sind auch nach 50 Tagen noch disponiert für Thrombosen und ihre Folgen für die epidermale Matrix. Meine Befunde zeigen, dass die klinische Beurteilung nicht ausreicht, um die Heilung vollständig zu ermessen.

Makroskopisch nicht erkennbare, ultrastrukturelle Veränderungen bestehen weiterhin und beeinträchtigen den erfolgreichen Abschluss der Heilung auch noch nach 50 Tagen Klinikaufenthalt selbst unter sterilen, optimalen Bedingungen. Rezidive sind nicht auszuschließen. Allerdings scheint die vorübergehende Reparatur bzw. Abdeckung der Wunde auszureichen, um bei den Tieren eine schmerzfreie oder schmerzarme Belastbarkeit der erkrankten Klaue herzustellen.

Das **Stratum corneum biegt** mit dem oberen Stratum spinosum nur am Tag 20 am Rande des Wundkraters deutlich **um 90° um**. Die waagrecht verlaufende Verhornungsgrenze verläuft danach abrupt senkrecht auf die Dermis zu. Andeutungsweise ist dieses Phänomen auch schon am Tag 5 zu sehen. Die Hornzellen am umgeknickten Wundrand kommen auf der Dermis zu liegen. Diese programmiert abgestorbenen Hornzellen stellen aber keinen funktionellen, festen Kontakt zur Dermis her. Da sie die Dermis aber trotzdem berühren und diese partiell abdecken, soll hier von einer scheinbaren (Pseudo-) Epithelialisation gesprochen werden. Anscheinend ist die "echte" Epithelialisation für solch einen großen Wundkrater nicht effektiv und schnell genug und nicht aus reichend, um der Wunde genügend Schutz vor weiteren Störfaktoren auf die Wundheilung zu bieten. Vorübergehende Ersatzmechanismen müssen sich hier einschalten, um die Defizite in der Epithelialisation zu kompensieren. Der Wundrand wird mechanisch geschützt, indem sich eine dicke mechanisch stabile Hornschicht auf die neu gebildete dünne Epidermisschicht im Wundkrater verlagert.

Das Phänomen der "einfallenden" oberflächlichen Randbereiche in den Wundkrater wird auch beim *Ulcus ventriculi* beobachtet (*Ossent, persönliche Mitt.*). Es ist als Mechanismus zum Verschluss des Wundkraters zu deuten. Andererseits ist bekannt, dass sich distale Hornmassen im Ballenbereich übereinanderschieben (*Fürst, 1992*). Aus dieser Tatsache ist abzuleiten, dass die Hornmassen aus der Nachbarschaft des Geschwürs so verschoben werden, dass damit auch der Wundkrater nach und nach ausgefüllt wird.

**Suprabasale Mitosen** treten in der Epidermis in allen, besonders in den späteren untersuchten Stadien in der Wundperipherie im Verlauf der Heilung auf. Das Auftreten der suprabasalen Mitosen wird als Notwendigkeit zur Zellvermehrung gedeutet. Es dient einerseits dem Nachschub von randständigen Epidermiszellen, die während

der Wundheilung in der äußeren Haut den epidermalen Verschluss der Wunde von der Peripherie aus besorgen. Von *Mülling et al. (1994b)* werden suprabasale Mitosen als Kompensationsversuch für die mangelhafte Versorgung der verhornenden Zellen über eine Vergrößerung der Oberfläche und Verkürzung der Diffusionsstrecke gedeutet. Dadurch kommt es zu einer Zergliederung des Papillarkörpers mit geringerer mechanischer Belastbarkeit in diesem Bereich. Um den großen Defekt in der Nachbarschaft zu schließen, ist eine höhere Proliferation an Keratinozyten zur Bereitstellung neuer Epidermiszellen nötig. Übereinstimmend mit den Befunden der vorliegenden Untersuchung kommen bei der epidermalen Regeneration der Maus ebenso vermehrt Mitosen in den suprabasalen Lagen vor (*Argyris, 1976*). Nach *Marks (1985)* stellen suprabasale Mitosen in der dyskeratotischen Epidermis eine kompensatorische Hypertrophie dar.

**Melanozyten** und **Merkelzellen** treten vereinzelt zwischen den Basalzellen auf, nachdem mit dem trichterförmigen Ausschneiden des Geschwüres die gesamte epidermale Matrix entfernt worden war. Langerhanszellen konnten nicht beobachtet werden. Die Regeneration der Melanozyten und Merkelzellen ist ein Zeichen für eine fortgeschrittene Heilung im Bereich des Geschwüres. Melanozyten differenzieren sich nicht aus Keratinozyten, sondern stammen ursprünglich aus der Neuralleiste und sind während der Embryonalentwicklung in die Epidermis eingewandert. Sie besitzen weder Tonofilamente noch Desmosomen (*Leonhardt, 1990*). Merkelzellen sind im Lichtmikroskop auffallend helle sekundäre Sinneszellen in der epidermalen Basalzellschicht, die osmophile Granula enthalten und spezielle Kontaktzonen zu den nackten Axonen freier Nervenendigungen ausbilden (*Halata, 1975 und 1990*). *Buda und Mülling (2000)* finden in der Rinderklaue im proximalen Abschnitt des Ballensegmentes einzelne Nervenfasern, die die Basalmembran durchdringen und zwischen den Spinosazellen enden. Weiterhin halten diese Autoren einzelne nicht epidermale Zellen der Oberhaut aufgrund ihrer immunhistochemischen Reaktion mit CGRP (calcitonin gene-related peptide) für Merkelzellen.

Die **Größe der Spinosazellen** im mittleren bis oberen Stratum spinosum ist zeitweise auffallend variabel. In ein und demselben Präparat finden sich Bezirke mit dicken gequollenen Zellen von bis zu 30 µm Durchmesser und aufgelockertem Zytoplasma und Bereiche mit kleinen geschrumpften Spinosazellen von nur 10 bis 15 µm. Die

geschrumpften Spinosazellen nehmen eine spindelförmige Gestalt an. Derart veränderte Germinativzellen sind nicht mehr in der Lage, sich zu widerstandsfähigen Hornzellen zu differenzieren. Die Basal- und Spinosazellen zeigen die stärksten Abweichungen von der Norm und die Hornzellen die geringsten. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für dieses Phänomen:

1. Die verhornenden Zellen haben ihren Stoffwechsel bereits auf die marginale Versorgung (Minimalversorgung) ausgerichtet und Verminderungen in der Versorgung werden in diesen Zellen besser verkräftet. Basalzellen und Spinosazellen hingegen sind aufgrund der Gefäßlosigkeit in der Epidermis auf eine optimale Versorgung per diffusionem angewiesen, reagieren auf Schwankungen in der Versorgung sehr sensibel und zeigen sofortige Veränderungen. Allerdings mangelt es den aus dyskeratotischen Zellen hervorgegangenen Hornzellen an den nötigen Baustoffen, vor allem an Zytokeratinen, für eine belastungsfähige Stabilität in den Zellen.

2. Das Untersuchungsmaterial gibt mit jeder Probe die strukturelle Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder. Die Entwicklung und Differenzierung einzelner Zellen sind damit nicht zu verfolgen, zumal die Proben jedes Mal aus einem anderen Viertel des Geschwüres stammen. In Proben mit stark dyskeratotischer lebender Matrix ist die Verhornung der darüberliegenden Zellen bereits abgeschlossen. Möglicherweise sind sie aus ursprünglich orthokeratotischen Germinativzellen entstanden. Intermittierend eintretende Mikrozirkulationsstörungen können dafür verantwortlich sein, dass verschiedene Zellgenerationen unterschiedlich stark gestört sind.

3. Weiterhin ist denkbar, dass die schweren Störungen in der lebenden Epidermis auf Bereiche von wenigen Millimetern beschränkt sind (Einflussbereiche einzelner Papillen, in denen die Kapillaren verschlossen sind), die bei der Probennahme exakt getroffen wurden und die von der benachbarten weniger geschädigten Epidermis, die außerhalb der Präparate liegt, im Bereich des Stratum corneum kompensiert werden. Allerdings ist die Reparatur durch kompensatorische Hyperplasie der hypoxisch geschädigten Epidermiszellen qualitativ minderwertig.

Ob und wie aus vorgeschädigten Germinativzellen tatsächlich Hornzellen entstehen können, die in ihrer Struktur und Funktion normalen Hornzellen entsprechen, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Dazu könnten Zell- oder Organ-kulturen mit Keratinozyten aus der Rinderklaue möglicherweise wertvolle Dienste leisten.

Während der beschriebenen Stadien der Wundheilung zeigen sich strukturelle Veränderungen in den Keratinozyten u.a. im **Keratinfilamentgehalt** im Verlauf ihrer Differenzierung. Ob die morphologisch erfassbaren quantitativen Veränderungen im Keratinfilamentgehalt mit qualitativen Veränderungen der Keratinproteine korrelieren, wurde mit der SDS-PAGE-Elektrophorese untersucht und wird später diskutiert (s. Kap. E.4.2). Die Spinosazellen sind teilweise zytoplasmaentleert und enthalten nur noch ein reduziertes Keratinfilamentgerüst. Helle und dunkle Zellen liegen nebeneinander. Eine Normalisierung scheint im Verlauf der Wundheilung nicht in jedem Fall einzutreten. Am Tag 50 ist in vielen Fällen noch keine orthokeratotische Keratinisierung und Verhornung zu verzeichnen.

Die Qualität des Hornzellverbandes der Klauenkapsel ist nach *Bragulla und Mülling (1994)* unter anderem von der Zytoarchitektur der einzelnen Hornzelle abhängig. Die Zytoarchitektur wird insbesondere durch die Zusammensetzung, die Menge und die Anordnung der Keratinfilamente sowie deren ausgewogene Einbettung in Intermediärfilament-assoziierten Proteinen und durch den Gehalt an SS-Gruppen bestimmt. Die hohe Stoffwechselleistung der verhornenden Zellen bei der Synthese der spezifischen Produkte ist abhängig von einer ausreichenden Energieversorgung und in großem Maße von einem ausgewogenen Angebot an Bausteinen (*Mülling et al., 1994b*). Eine unzureichende nutritive Versorgung der verhornenden Epidermiszellen infolge verminderter Durchblutung der Lederhautgefäße oder Störung des Stoffaustausches durch ein verändertes Lederhautbindegewebe und eine gestörte Basalmembran zeigt sich in der verminderten Bildung der spezifischen Syntheseprodukte der Epidermiszellen (*Marks, 1984*). Da die Epidermis ein avaskuläres Gewebe ist, sind die Epidermiszellen auf die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff aus den Lederhautgefäßen angewiesen. Dies macht sie sehr empfindlich für jegliche Mikrozirkulationsstörungen, besonders im Bereich mit hoher Hornsyntheserate, z.B. im Ballen (*Budras et al., 1998*). Schon minimale Zirkulationsstörungen rufen Veränderungen in der Keratinisierung hervor (*Budras et al., 1996*). Die dyskeratotischen Zellen der Klauenepidermis synthetisieren übereinstimmend mit *Mülling et al. (1994b)* Keratinfilamente und Intermediärfilament-assoziierten Proteine nur in vermindertem Umfang und unzureichender Qualität. Die ordnungsgemäße Verhornung wird verhindert, da auch die molekularen Verbindungen, die die Hornzelle stabilisieren, reduziert sind.

Wie auch *Marks (1984)* in seiner Arbeit postuliert, führen Vasokonstriktion oder Thromben über eine Verlangsamung des Blutstromes im Kapillargebiet zu einem ischämisch bedingten Mangel an erforderlichen Nährstoffen und Energie für die Proteinsynthese. Ein Mangel führt zwangsläufig zu einem Synthesedefizit der Keratinfilamente und IFAPs in den dyskeratotischen Epidermiszellen. Diese ist durch eine Minderung der Bildungsrate und Aggregation der Keratinfilamente gekennzeichnet. Diese Zellen fallen für einen orthokeratotischen Verhornungsprozess aus. Die Aggregation von Keratinfilamenten in Zellen am Wundrand stimmt nach Untersuchungen von *Eckert und Caputi (1985)* mit der Theorie überein, dass die Filamentaggregation ein wichtiger Schritt in der Reorganisation des Zytoskelettes ist. Diese Reorganisation von Keratinfilamenten führt bei der Migration der Zellen in die Wunde zu einem initialen Anstieg in der Filamentaggregation.

Durch Energiemangel in den Zellen kommt es zu einem Versagen der Natrium-Kalium-ATPase in der Zytoplasmamembran und über den intrazellulären Natriumanstieg zu einem Wassereinstrom in die Zelle und dann auch in die Organellen (*Sandersleben, 1989*). Durch eine Ballonierung der Organellen mit deren anschließenden Zerstörung kommt es zum Mangel an Keratinfilamenten. Die rarifizierten, kaum gebündelten Keratinfilamente werden auseinandergedrängt und befinden sich nur noch in der Zellperipherie.

**Intermediärfilament-assoziierte Proteine** treten besonders in Form von Keratohyalin granula sehr inkonstant auf. Bereiche, die wegen ihrer Lokalisation den weichen Verhornungsmodus mit ausgebildetem Stratum granulosum erwarten lassen, weisen nur in knapp der Hälfte der Fälle ein deutliches Stratum granulosum auf. In Bereichen harter Verhornung ist häufig ein Stratum granulosum ausgebildet. Allerdings beschränken sich die Keratohyalin granula meist auf wenige Granulosazellen über den Lederhautpapillenspitzen.

Auch in oberflächlichen Schichten des Stratum corneum persistieren lokal Keratohyalin granula, was als Zeichen einer unvollständigen Verhornung zu werten ist.

Fetal durchlaufen sämtliche Klauensegmente ein Stratum granulosum (*Mülling, persönliche Mitt.*). Die fetale Klauenepidermis differenziert sich unter Durchlaufen eines Stratum granulosum. Dies ist auch für den fetalen Pferdehuf beschrieben (*Bragulla, 1996 und 1998*). Im Verlauf der Wundheilung erfolgt eine Reaktivierung fetaler Differenzierungsprogramme. Warum allerdings im entgegengesetzten Fall im Bereich des

Weichballens das Stratum granulosum vielfach fehlt, ist anhand der vorliegenden Proben nicht erklärbar. Während der Verhornung verteilen sich die Intermediärfilament-assoziierten Proteine in der gesamten Zelle und sind im gesunden Stratum corneum nicht mehr als Keratohyalingranula nachweisbar. Eine Persistenz von Keratohyalingranula im Stratum corneum während der Wundheilung von RUSTERHOLZschen Klauengeschwüren lässt auf eine Störung der Verteilung bzw. des Zerfließens der IFAP und dadurch auf eine eingeschränkte biochemische Verbindung der Proteine schließen. Welchen Einfluss das Klauengeschwür bzw. die Vorgänge bei der Wundheilung auf die Abläufe der Synthese und Vernetzung der Intermediärfilament-assoziierten Proteine hat, ist im Einzelnen unklar. Gegenstand weiterer Untersuchungen könnte der Nachweis sein, ob die Disulfidbrücken auch im veränderten Stratum corneum erhalten bleiben, um eine feste, stabile Verbindung der Keratinfilamente miteinander zu gewährleisten.

Einer der auffallendsten, immer wiederkehrenden Befunde ist das gehäufte Auftreten von **Mitochondrien**, denen die inneren Cristaemembranen fehlen. In den suprapapillären und oberen peripapillären Basal- und Spinosazellen sowie in einigen Fibroblasten im Stratum papillare der Dermis ist diese Veränderung besonders deutlich. Da die Veränderungen der Mitochondrien bereits lichtmikroskopisch erkennbar sind (perinukleärer schaumförmiger Saum) muss hier zusätzlich zur Lyse der Cristaemembranen eine primäre Schwellung der Mitochondrien vorliegen. Diese ist durch vermehrte Flüssigkeitsaufnahme bedingt.

Die Veränderungen in den Mitochondriencristae treten in den suprapapillären und oberen peripapillären Basalzellen und unteren Spinosazellen gehäuft auf, weil in der Epidermis an den Papillenspitzen ein nutritiver Mangel stärker ins Gewicht fällt als in den interpapillären Zellen. Folgen einer Störung des Energiesystems der Zelle d.h. ihres Ionenmilieus, sind trübe Schwellung und vakuoläre Degeneration der betroffenen Zelle. Erstreckt sich die vermehrte Flüssigkeitsaufnahme vorzugsweise auf die Mitochondrien, deren Cristae nach *Riede und Schäfer (1995)* empfindliche Indikatoren des Energiestoffwechsels sind, so liegt ein trübe Schwellung vor. Findet die Wasseransammlung zusätzlich in den erweiterten Schläuchen des endoplasmatischen Retikulums oder im Zytoplasma statt, so spricht man von vakuolärer Degeneration. Die trübe Schwellung, eine leichte Form des Zellödems, entwickelt sich im Zuge einer Schädigung der Membranen der Zelle bzw. ihrer Organellen. Dabei

kommt es zur gesteigerten Wasseraufnahme, die sich besonders an den Mitochondrien in Form einer Schwellung zu erkennen gibt (*Sandersleben, 1989*). Intra vitam vorgeschädigte Mitochondrien reagieren sehr sensibel auf eine Fixierung und zeigen diese hochgradigen Veränderungen im histologischen Präparat frühzeitiger und deutlicher als kräftige, robuste, intakte Mitochondrien. Letztendlich handelt es sich um ein Fixierungsartefakt, das jedoch durch eine Vorschädigung intra vitam vorbereitet wurde. Diese degenerativen Veränderungen der Mitochondrien, die möglicherweise durch ungünstige Fixationsverhältnisse noch stärker in Erscheinung treten, sind nach *Marks (1984)* als Ausdruck einer zellulären Schädigung zu werten. Die durch Mikrozirkulationsstörungen ausgelöste Hypoxidose ist der entscheidende Faktor für die zelluläre Störung.

Unter den **Zellkontakten** wird im Vergleich zum gesunden Gewebe zu allen Zeitpunkten des Untersuchungszeitraumes eine mäßig bis stark verminderte Zahl an **Desmosomen** in den Basal- und Spinosazellschichten vor allem im Wundzentrum festgestellt.

Augrund ihrer großen Zahl in gesunder Epidermis stellen sie eine innige Verbindung der Spinosazellen untereinander her (*Mülling, 1993*). Mit dem Um- und Abbau der Desmosomen übernimmt der Interzellularkitt die Adhäsionsfunktion der Desmosomen. In Übereinstimmung mit *Mülling (1993)* sind die Desmosomenreste im Stratum corneum für die Zellverbindung von untergeordneter Bedeutung. Da die formale Gestaltung des tonofibrillären Zytoskelettes von der Desmosomenanordnung abhängt (Tonofibrillen-Desmosomen-Komplex), ist die Stabilität der Epidermis bei Abnahme der Desmosomenzahl geschwächt. Die Synthese von Tonofilamenten und Desmosomen ist mangelhaft. Weiterhin führt eine Separierung der Zytoplasmafortsätze durch Verlust der desmosomalen Kittsubstanz oder der interdesmosomalen Filamentstruktur zu einer unvollständigen Verankerung der Zellen untereinander. Die Zellen runden sich meist ab und lassen desmosomentragende Zytoplasmafortsätze vermissen (akantholytische Dyskeratose). Im Endstadium kommt es zu einer vollständigen Ablösung der Zellen (Pseudoakantholyse).

Trotz des vorherrschenden Energiemangels in den meisten Zellen des Stratum basale und Stratum spinosum sind kaum **gap junctions** nachweisbar. Wenige **annular gap junctions** (AGJ) werden in den Zellen des Stratum spinosum gefunden. Daher kommt es zu den späteren Terminen zu einer ungenügenden Synchronisation in der

Verhornung. Die Aufgabe der gap junctions und AGJ besteht in der Synchronisation der Differenzierung (Verhornung). *Marks (1984)* misst ihnen eine Bedeutung beim transzellulären Transport von Energiesubstraten in höhere Zelllager bei, die auch von *Dirks (1985)* und *Mülling (1993)* beschrieben wird. Er beschreibt sie vor allem in Bereichen mit einer erhöhten Zellproliferation, da die Zellen infolge starker Mitoseaktivität mit zunehmender Stratifikation und Vergrößerung des Abstandes von den dermalen Blutkapillaren einen erhöhten Energiebedarf haben. Gap junctions und AGJ werden besonders in Geweben, in denen Defizite an Sauerstoff und Substraten vorherrschen, vermehrt gebildet. Wie schon von *Marks (1984)*, *Dirks (1985)* und *Mülling (1993)* erwähnt, sprechen auch hier die beobachteten diffusen elektronendichten Einlagerungen gegen die Artefakttheorie von *Fawcett (1981)*, der die Bildung von AGJ im Verlauf der Immersions-Fixation der Unterbrechung der Sauerstoffversorgung des entsprechenden Gewebeabschnittes zuschreibt. *Dirks (1985)* und *Mülling (1993)* postulieren die Genese der AGJ durch Einstülpung eines Zellfortsatzes in eine benachbarte Zelle. Die AGJ sind zum großen Teil nicht abgeschnürt und behalten eine Verbindung zum Interzellularspalt (*Mülling, 1993*). Sie können jedoch auch abgeschnürt werden. Nach *Marks (1984)* behalten sie teilweise Verbindung zum Interzellularspalt oder werden vollständig im Interzellularspalt abgeschnürt. Die von den AGJ umschlossenen fingerförmigen Zytoplasmaausstülpungen können sich über mehrere Zelllagen erstrecken (*Dirks, 1985*). Der Inhalt der AGJ besteht aus eingeschlossenem Zytoplasma, Ribosomen und Organellen (*Hayward, 1983*). Der im vorliegenden Untersuchungsgut auffällige Mangel an gap junctions und AGJ ist gewiss die Ursache für die im nächsten Abschnitt beschriebene, häufig beobachtete Störung in der Verhornung.

Eine deutliche, abrupte **Verhornungsgrenze**, d.h. die durchgehende, seicht wellige Linie zwischen lebenden (noch verhornenden) und bereits verhornten Zellen fehlt in vielen Fällen bis zum Tag 20 vollständig. In dem Bereich geht die Verhornung nahezu unmerklich vonstatten. Hier zeigt sich die fehlende Synchronisation durch mangelnde gap junctions. Am Tag 50 wird ein abrupter Übergang in die Verhornung wieder in vielen Fällen beobachtet. Übergangszellen fehlen gleichermaßen. Frühzeitig verhornende lebende Epidermiszellen stören den mechanischen Zusammenhalt der Epidermis.

Bis zum Tag 20 ist die zeitliche Koordination bei der Differenzierung der Zellen gestört. Bei fehlendem Substratmangel bleibt die normalerweise übliche Vergrößerung der verhornenden Zellen (Übergangszelle) beim "Sprung" in die Verhornung aus. Damit einhergehend fehlt auch die typische spongiöse Zytoarchitektur, die der normalen Hornzelle nach der Bauweise eines unterkammerten Wasserkissens eine stoßdämpfende Elastizität verleiht. Die Stoßdämpferfunktion ist eingeschränkt. Die Wiederherstellung der abrupten und linearen Verhornungsgrenze bis zum Tag 50 ist ein deutlicher Schritt zur Heilung.

#### 4.2 Stratum corneum: Zellproteine und marginales Band

Bei der **gelelektrophoretischen** Auftrennung der Zellproteine aus den Zellen des Stratum corneum konnte in den untersuchten Proben trotz unterschiedlicher Entnahmezeitpunkte und unterschiedlicher Versorgung mit dem Vitamin Biotin eine Übereinstimmung der Proteinbanden in Anordnung und Dicke festgestellt werden. Die dargestellten Proteinbanden deuten darauf hin, dass trotz offensichtlicher morphologischer Unterschiede im Stratum corneum keine qualitativen Unterschiede in den Proteinen im gelelektrophoretischen Nachweis zu finden sind. Danach sind die Exprimierung und Veränderung der Zellproteine im Verlauf der Keratinisierung und Verhornung vermutlich konstante Prozesse und phylogenetisch wie ontogenetisch konservativ, das heißt, dass trotz veränderter Versorgungslage in den Zellen das exprimierte Muster der Zellproteine gleich bleibt. Auch *Watanabe et al. (1995)* beschreiben, dass die epidermalen Keratinozyten während der Wundheilung grundsätzlich die gleichen Zytokeratine exprimieren wie die basalen Keratinozyten in normaler Epidermis. Die Exprimierung der epidermalen Zytokeratine steht nach *Ekanayake-Mudyanselage et al. (1998)* unter dem Einfluss der Permeabilitätsbarriere. *Steinert und Idler (1975)* untersuchten die lebende Klauenepidermis und isolierten sieben bzw. acht Zytokeratine mit MG von 49 bis 65 kd, die sie jeweils der sauren bzw. basischen Gruppe zuordnen. *Cooper und Sun (1986)* stellten die epithelialen Zytokeratine des Rindes unabhängig von der Herkunft des Epithels dar und beschreiben insgesamt 15 Zytokeratine mit MG von 41 bis 67 kd. Die Untersuchung gesunden Hornes durch *Hochstetter (1998)* ergab sechs Zytokeratine mit MG von 44,4 bis 57,5 kd in der verhornten Ballenepidermis des Rindes. Der Nachweis erfolgte mit derselben Methode wie der hier angewendeten.

Eine stellenweise im Stratum corneum auftretende Verdickung des cornified cell envelope durch Anlagerung eines **marginalen Bandes** an die Innenseite der Zytoplasmamembran dient als Schutzfilm für die Hornzellen. Das marginale Band tritt in den untersuchten Proben stellenweise erstmals in der Peripherie der Hornzellen auf. Das Auftreten des marginalen Bandes ist in den beschriebenen Fällen als Zeichen einer vollständigen terminalen Differenzierung zu sehen. Allerdings ist das Vorkommen auf wenige Zellen beschränkt. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine unzureichende Synthese in den Zellen, in denen die zuvor beschriebenen Energiedefizite vorherrschen.

Nach *Matoltsy (1976)* und *Mülling (1993)* tritt das marginale Band in gesunder Epidermis bereits erstmals in den Übergangszellen auf. Diese Zellen wurden aber im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht gefunden. Daher ist es hier erst im Stratum corneum zu sehen. Es wurde dadurch identifiziert, dass es gemäß der übereinstimmenden Angaben in der Literatur von der Zytoplasmaseite an das innere Blatt der Zellmembran angelagert wird.

## 5. **Veränderungen der epidermalen Interzellularspalten**

Fast alle Proben weisen an jedem Termin mehr oder weniger geweitete, teils sogar extrem ausgedehnte **Interzellularspalten** besonders zwischen den Basal- und unteren Spinosazellen auf. Einerseits entstehen die weiten Interzellularspalten im Stratum basale und Stratum spinosum durch den dicht angrenzenden Defekt. Der Wundkrater ermöglicht u.a. ein Auseinanderweichen der Zellen und damit eine Auflockerung des zellulären Gefüges in seiner unmittelbaren Nachbarschaft. Weiterhin sind die Lederhautpapillen entzündungsbedingt ebenfalls gequollen und verdickt, was auch hier zu einer Vergrößerung der Papillenoberfläche führt, an der die Epidermiszellen auseinanderweichen und weite Interzellularspalten hinterlassen. Ferner ist durch das Eindringen eines entzündlichen Exsudates zwischen die Epidermiszellen ein Auseinanderweichen der Zellen zu erklären.

Die in dieser Untersuchung beobachtete **Spaltenbildung** im Stratum corneum resultiert vermutlich aus der verminderten Desmosomenzahl und der vermehrten Produktion und Ausschleusung qualitativ minderwertigen Interzellularkittes im Stratum spinosum. Durch die hypoxische Zellschädigung ist offensichtlich die Synthese des Interzellularkittes in den dyskeratotischen Differenzierungsabschnitten der Epider-

miszellen gestört. Die vermehrte Produktion minderwertigen Interzellularkittes äußert sich im teilweisen und vollständigen Verlust der Zelladhäsion. Er bietet keinen Halt an der Zellmembran. Dadurch wird der normalerweise gleichmäßig enge Interzellularspalt in der lebenden Epidermis gegen den Widerstand der Desmosomen stark erweitert und in der verhornten Epidermis treten Mikrorisse auf. Weiterhin konnte beobachtet und dokumentiert werden, dass eine innige Verzapfung zwischen Spinosazellen, die zur Verhornung anstehen, und benachbarten jungen Hornzellen nicht gegeben ist, sondern die Zellmembranen über weite Strecken geradlinig und parallel zueinander verlaufen.

Bei Qualitätsminderung des Interzellularkittes sind solche Bereiche für die Entstehung von Mikrorissen im Stratum corneum geradezu prädestiniert. Damit kann die wichtige Funktion des Interzellularkittes zur Abdichtung des Hornzellverbandes gegen das Eindringen und Aufsteigen von Infektionserregern nicht erfüllt werden (*Anthauer, 1996*).

*Schmid und Geyer (1994)* stellen eine erhöhte Zugfestigkeit des Klauenhorns bei biotinsupplementierten Tieren fest, welche auf einen verbesserten interzellulären Zusammenhalt des Hornes beruhte. *Budras und Preuss (1978)* beobachten im gesunden Hyponychium eine innige regelmäßige Verzapfung der jüngsten Hornzellen mit ihrer benachbarten zur Verhornung anstehenden Spinosazelle. Der Interzellularkitt gilt als bedeutendster interzellulärer Faktor mit Einfluss auf die Hornqualität (*Mülling und Budras, 1998; Mülling et al., 1994a*). Seine Hauptfunktion besteht in der Herstellung einer festen Verbindung zwischen den Hornzellen (*Anthauer, 1996; Budras und Bragulla, 1991; Mülling, 1993*).

Im epidermalen Interzellularspalt des vorliegenden Untersuchungsmateriales befinden sich ferner zahlreiche **membranhüllte Vesikel (MCG)**. Der Inhalt dieser interzellulär gelegenen Vesikel ist feinkörnig. Teilweise bestehen Kontakte der einschichtigen Vesikelmembran zur benachbarten Keratinozytenmembran. Hier stehen die Membranen (noch) miteinander in Verbindung. Aus den Befunden geht hervor, dass der Vorgang der Exozytose des membrane coating material gestört ist. Die normalerweise erfolgende Fusion der kurzen Membranstapel aus Strukturlipiden zu großen blattartigen Membranlagen, die mehrere Zellen grenzübergreifend überdecken, wird dadurch auch verhindert. Folglich ist die Qualität des Interzellularkittes

verringert und die Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen ist beeinträchtigt. Hier fehlt der intakte wirksame Interzellularkitt.

Auf die Bedeutung der MCG als Lieferanten des Interzellularkittes (MCM), einem bedeutenden Syntheseprodukt der Epidermiszellen im Verlauf ihrer Verhornung machen erstmals *Budras und Bragulla (1991)* im Pferdehuf und *Mülling (1993)* und *Mülling et al. (1994a)* in der Rinderklaue aufmerksam. Bei der ordnungsgemäßen Exozytose in gesunder Epidermis lagert sich die dreilagige Hüllmembran der intrazellulären MCG an die Zellmembran an und verschmilzt mit dieser. Die Hauptaufgabe des MCM in der Klauen- und Hufepidermis ist im Gegensatz zur Haut, eine Zell-zu-Zell-Adhäsion und damit die Integrität eines stabilen Zellverbandes zu gewährleisten (*Budras et al., 1998; Mülling und Budras, 1998*). Therapeutische Strategien zur Verbesserung des Interzellularkittes sollten entwickelt werden.

Neben Interzellularkitt füllen unterschiedliche Mengen entzündliches **Exsudat** die Interzellularspalten zusätzlich aus. Dabei ist der Interzellularkitt von der Zellmembran gelöst und das Exsudat sammelt sich zwischen Interzellularkitt und Keratinozytenoberfläche an. Anhand der Befunde ist davon auszugehen, dass die Füllung der epidermalen Interzellularspalten entzündlich bedingt ist. Besonders ausgeprägt ist dieses entzündliche Phänomen an den Tagen 10, 15 und 20 zu erkennen. Durch die austretende Flüssigkeit wird der Interzellularspalt massiv verbreitert und die Zellen werden bei maximaler Dehnung der Zellfortsätze auseinandergedrängt. Einige Desmosomen bleiben trotz Auseinanderweichen der Zellen noch lange erhalten und gewährleisten einen Zellzusammenhalt im geschädigten Gewebe.

Bis zu einem gewissen Grad sind die Keratinozyten in der Lage, durch Erweiterung ihres Interzellularspaltess Ansammlungen von Exsudat abzufangen. Stärkere interepitheliale Flüssigkeitsansammlungen führen jedoch zum Zerreißen der zytoplasmatischen Fortsätze oder zur mechanischen Separierung der Desmosomenhälften und damit zum Auftreten von Bläschen. Solche "spongiotischen" Erweiterungen beschreibt *Marks (1984)* in der Hufepidermis von Hufen, die am Rehe erkrankt sind. Die intensive Flüssigkeitsansammlung im Interzellularspalt führt über Druckbelastungen auf die Basal- und Spinosazellen zu weiteren degenerativen Veränderungen wie Beeinträchtigung der Kittsubstanzsynthese und überhöhte Syntheserate qualitativ minderwertigen Kittes mit Verlust der Zelladhäsion. Jedoch kann eine ungenügende Qualität des Interzellularkittes, der eine Zelladhäsion nicht aufrecht erhalten kann

und die beobachtete enorme Erweiterung der Interzellularspalten nicht verhindert, durch vermehrte Synthese nicht kompensiert werden.

Die Exsudation spielt hier anscheinend eine große Rolle. Entzündungsphänomene in der Epidermis verursachen eine intraepitheliale, nach den eigenen Befunden offensichtlich seröse Entzündung. Aus den dermalen Blutgefäßen ausgetretene Blutflüssigkeit diffundiert weiter in die Epidermis und reichert sich dort an. Die Entzündung ist an gefäßhaltige Gewebe gekoppelt (*Sandersleben, 1989*). Eine Ausdehnung der Entzündung auf die Epidermis ist vorstellbar und wird durch eigene Befunde belegt.

Epidermal eingedrungene Entzündungszellen wie **Lymphozyten und Granulozyten** stellen in der vorliegenden Untersuchung einen weiteren noch nicht in der Literatur niedergelegten Befund im Verlauf der Wundheilung an der Klaue dar. Im humanmedizinischen dermatologischen Schrifttum wird in der Phase der Entzündung ein zahlreiches Auftreten von Granulozyten in der bindegewebigen Dermis beschrieben, die dafür sorgen, dass der Wundbereich von eingedrungenen Bakterien, Schmutz, Zelltrümmern und ausgedienten Blutgerinnseln "gesäubert" wird. Auch im vorliegenden Untersuchungsgut finden sich Lymphozyten und Granulozyten im Lederhautbindegewebe. Hier dringen sie jedoch weiter bis in die Interzellularspalten der Basal- und Spinosazellschichten, was durch das aufgelockerte Interzellulargefüge möglich ist. Eine zeitliche Begrenzung des Auftretens dieser Entzündungszellen ist nicht deutlich, da bis zum Tag 50 noch Granulozyten in den epidermalen Zellschichten beobachtet werden.

Bei der Heilung von Wunden an der Fußungsfläche der Klaue überwinden die Entzündungszellen offenbar die Basalmembran und dringen bis in untere epidermale Schichten vor. Diese Hypothese wird gestützt durch die Aussage von *Leonhardt (1990)*, nach dem bei Hauterkrankungen Ansammlungen von Gewebsflüssigkeit und von Lymphozyten in den Interzellularspalten der Spinosazellschicht auftreten können und von *Agaiby und Dyson (1999)*, nach denen T-Lymphozyten die neugebildete Epidermis infiltrieren, indem sie sich zwischen die migrierenden Keratinozyten schieben. *Liebich et al. (1999)* beschreiben Lymphozyten, die in die Epidermis migrieren, um dort einen Antigenkontakt zu epithelialen Langerhanszellen herzustellen. Eine Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und Keratinozyten vermuten *Agaiby und Dyson (1999)*. *Karsai (1994)* beschreibt bei der Hautentzündung (Dermatitis) eine Vermehrung der intra- und interzellulären Flüssigkeit sowie Auflockerung der Zell-

schichten im Epithel. Nach *Boosman et al. (1989)* ist eine Infiltration von Entzündungszellen in der Pododerma selten. Das Auftreten von Granulozyten in der Epidermis wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben. Ihre Invasion in die Epidermis wirkt sich möglicherweise schädigend auf das Gewebe aus, weil die Freisetzung ihrer Enzyme Schädigungen im neu gebildeten Gewebe erwarten lassen. Die Fähigkeit der bovinen Entzündungszellen, die Komponenten der dermoepidermalen Grenze zu überwinden und zwischen die Zellen der Klauenepidermis vorzudringen ist ein Phänomen, dem man in der weiteren Forschung großes Interesse beimessen sollte. In diesem Kontext ist das Interesse auf die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), z.B. Collagenase-1 gelenkt, die von bestimmten Zytokinen aktiviert werden und Kollagenbündel abbauen können (*Ashcroft et al., 1997b; Pilcher et al., 1998; Pilcher et al., 1999; Tarlton und Webster, 2000*). Die in neuesten Arbeiten untersuchten MMPs könnten als Möglichkeit der Wegbereitung für die Zellwanderung dienen. Da der Nachweis von Entzündungszellen im vorliegenden Untersuchungsgut zeitlich von der kutanen Wundheilung abweicht, ist eine Beeinflussung der Probenentnahme auf den Wundheilungsverlauf denkbar. In Abweichung von der Literatur (*Clark, 1993a*) finden sich hier zu jedem untersuchten Zeitpunkt Granulozyten und Lymphozyten in der Dermis und Epidermis. Nach *Banks (1993)* hängt die Dauer der Entzündungsphase von der Ausdehnung des Gewebeschadens, dem Grad der Verschmutzung und der Infektion ab. In meiner Studie ist jedoch von optimaler Wundversorgung auszugehen. Nach *Agaiby und Dyson (1999)* erreichen T-Lymphozyten am 10. Wundheilungstag ihr Maximum in Hautwunden. Dort können sie in geringen Mengen noch sieben bis acht Monate später vorkommen. Granulozyten hingegen werden nur sehr kurze Zeit in der Wunde angetroffen. Sie haben eine kurze Lebensdauer von ca. 8 Tagen und werden rasch ersetzt.

Die Infiltration der Granulozyten ist auch positiv im Sinne der Wundheilung zu bewerten, weil sie in einer Wunde zur Aktivierung des Immunsystems und zur Demarkation des geschädigten Gewebes führen. Dieses wirkt sich günstig auf die Dauer der Heilung aus.

## **6. Unterschiede zur Wundheilung in der äußeren Haut**

Nach den vorliegenden Ergebnissen lässt die Wundheilung an der Klaue eine zeitliche Einteilung in die Phasen, wie sie für die Wundheilung an der äußeren Haut beschrieben werden (Kap B.2.1), nicht deutlich erkennen. Die erste Phase (Verletzung/

Insult) zeigt sich quasi zu jedem Termin, an dem ein Biopat aus dem Wundbereich entnommen wird. Dabei werden jedes Mal erneut dermale Blutgefäße unter Blutaustritt durchtrennt. Die nachweisbaren Thromben in den Blutgefäßen resultieren vermutlich jedoch nicht aus dieser neuen Läsion, sondern müssen schon vor der Entnahme bestanden haben, da das Material sofort nach der Entnahme in Fixierungslösung verbracht wurde. Die Entzündung, die zu jedem Termin erkennbar ist, lässt sich zeitlich nicht begrenzen. Sie folgt grundsätzlich den gleichen Prinzipien wie bei der kutanen Wundheilung, aber weicht zeitlich sehr stark von ihr ab. Die Proliferationsphase während der Wundheilung an der Klaue ist anhand suprabasaler Mitosen in der Epidermis zu erkennen. Eine Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen wurde in vorliegendem Untersuchungsmaterial nicht beobachtet.

Zwei weitere Vorgänge sollen hier besonders hervorgehoben werden:

Die **Wundkontraktion** ist ein wichtiges Element in der Wundheilung und unterstützt den Verschluss von Wunden, deren Wundränder nicht adaptiert werden konnten. Sie reduziert die Wundfläche, die mit Epithel abgedeckt werden muss (*Martin, 1997*). Nach *Bryant (1987)* ist eine Wundkontraktion nur möglich, wenn das umgebende Gewebe geschmeidig und dehnbar genug ist, um einen solchen Vorgang zu erlauben. Die Wundkontraktion wird im Wesentlichen von Myofibroblasten bewirkt. Im vorliegenden Untersuchungsmaterial wurden Fibroblasten in der Dermis gefunden, die einige morphologische Merkmale von Myofibroblasten aufweisen. Dies sind gefurchte Zellkerne, deutliches endoplasmatisches Retikulum und eine basalmembranähnliche Umhüllung der Zellen. Möglicherweise sind einzelne nicht ausdifferenzierte Myofibroblasten in der stark modifizierten Klauenhaut erhalten geblieben. Weitere essentielle Merkmale für Myofibroblasten (dense bodies, Aktinfilamente und interzelluläre gap junctions) fehlen jedoch oder waren undeutlich.

Eine Kontraktion der Wundränder wird durch die feste starre Struktur des verhornten Klauenschuhes verhindert. Die dafür zuständigen besonderen Zellen, die Myofibroblasten, könnten ihre Funktion nicht erfüllen und ihre Differenzierung scheitert aufgrund der lokalen Gegebenheiten. Somit ist diese Phase der Wundheilung (Wundkontraktion) von der äußeren behaarten Haut nicht auf die Wundheilung an der Klaue übertragbar. In der Klaue müssen Ersatzmechanismen zum Wundverschluss stattfinden. Nach *Clark (1993b)* und *Martin (1997)* wird die Wundkontraktion von Wachstumsfaktoren stimuliert. Interessant wäre, in weiterführenden Untersu-

chungen festzustellen, woran das Auftreten von Myofibroblasten an der Klaue scheitert, ob solche Wachstumsfaktoren in der Klaue vorkommen und ob und wie man sie stimulieren könnte, um einen schnelleren und effizienteren Wundverschluss zu erreichen.

Frühe Stadien der **Reepithelialisierung** der Wunde mit Zeichen einer beginnenden Migration der Epidermiszellen, wie sie in der humanmedizinischen dermatologischen Schrifttum beschrieben werden, konnten im vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht beobachtet werden.

Diese Befunde und die Modifikation der Klauenleder- und -oberhaut lassen vermuten, dass die epidermale Wundabdeckung während der Wundheilung an der Klaue von den Vorgängen an der äußeren Haut (s. auch Kap. E.4.1) abweicht. Nach klinischen Beobachtungen ist ein Geschwür nach drei Tagen mit Epithel abgedeckt. Die schnelle Abdeckung so großer Wundkrater ist durch die alleinige Reepithelialisation vom Rand her nicht zu erklären. Eine inselartige Reepithelialisation der Wunde von teilungsfähigen Basalzellen, die trotz des Ausschneidens in den epidermalen Vertiefungen verblieben sind, ist vorstellbar. Diese Tatsache ist ein wichtiges Argument dafür, die Lederhaut bei der Versorgung des Geschwüres nicht mehr als nötig zu schädigen und damit die inselförmigen heilungsfähigen Epidermiszellen zu erhalten. Andererseits sind auch materielle und methodische Mängel vorstellbar, da die Intervalle der Probennahme aus Tierschutzgründen so weit gewählt werden mussten. Meist waren die Präparate mit mehreren Schichten lebender und sogar verhornter Epidermis überdeckt. Die frühen Stadien der epidermalen Regeneration vollziehen sich bereits ab 12 Stunden nach der Verletzung (*Krawczyk und Wilgram, 1975*). In der Haut ist die Reepithelialisierung in komplikationsfreien Fällen bereits nach 14 bis 20 Tagen abgeschlossen (*Bryant, 1987*). Bei der Klaue spielt die Reepithelialisierung möglicherweise in dieser Form keine Rolle, sondern besteht aus einem Zusammenwirken mehrerer Mechanismen, in dem unter anderem eine inselförmige Reepithelialisation von Basalzellen in den Zotten erfolgt.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse stellen ein erstes Gerüst für weiterführende Untersuchungen über den Heilungsverlauf von Klauenläsionen dar. Aufgrund der erhobenen Befunde erscheint eine Einteilung der Wundheilung an der Klaue in die gleichen Phasen wie bei der kutanen Wundheilung zunächst nicht sinnvoll. Um

dieses abschließend zu beurteilen ist die Beschreibung des zeitlichen Wundheilungsablaufes an der Klaue noch recht lückenhaft und es bedarf weiterer Forschung.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse entscheidende Sachverhalte in der Heilung auf.

- Die Ergebnisse weisen auf die große Bedeutung der Mikrozirkulation für die Heilung hin. Die strukturellen Veränderungen sind auch bei der klinischen Heilung überwiegend mit Störungen der Zirkulation zu erklären oder auf diese zurückzuführen.

- Einige Grundprinzipien aus der kutanen Wundheilung konnten mit den vorliegenden Befunden verifiziert werden (z.B. Entzündung). Für andere Ereignisse ergaben die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung keine Anhaltspunkte (z.B. Wundkontraktion). Der zeitliche Ablauf der einzelnen Phasen weicht nach den eigenen Befunden in jedem Fall deutlich von dem der kutanen Wundheilung ab.

- Auch klinisch als geheilt eingestufte Klauen haben aufgrund der festgestellten Strukturschwächen weiterhin eine Prädisposition für Rezidive. Die vollständige Heilung ist sehr viel langwieriger als allgemein angenommen und dauert 6 bis 12 Monate.

- Mit den Befunden lässt sich die von Klinikern und Praktikern ständig gemachte Beobachtung erklären, dass strukturelle Schwachpunkte im Geschwürsbereich über lange Zeit bestehen bleiben. Primär verantwortlich dafür sind die weiterhin vorhandenen dyskeratotischen Veränderungen in der lebenden und verhornten Epidermis.

## **7. Wirkung einer Biotinsupplementation auf den Heilungsverlauf**

Um die Entwicklung der Qualität von ausgewählten Bereichen des epidermalen Klauengewebes während des Wundheilungsverlaufes bei den untersuchten Tieren besser miteinander vergleichen zu können, wurde die statistische Untersuchung der Proben durchgeführt. Die Aussagen beschränken sich hier auf die untersuchten Qualitätsmerkmale und auf das vorhandene Patientengut. Rückschlüsse auf die sogenannte "Grundgesamtheit" (die Menge aller Rinder, über die mit Hilfe einer statistischen Studie eine Aussage gemacht werden soll) sind nur sehr eingeschränkt möglich.

Zwischen den Einzeltieren sind starke Unterschiede bezüglich der strukturellen Qualität offensichtlich. In Einzelfällen zeigen Tiere, die mit Biotin supplementiert wurden eine deutliche Verbesserung der bewerteten Qualitätsfaktoren. Aber bei der gleichen

Anzahl von Tieren hat sich keine Änderung und bei einem weiteren Drittel dieser Gruppe sogar eine Verschlechterung ergeben.

Für die gesamte Gruppe sind im vorliegendem Material keine statistisch nachweisbaren Unterschiede feststellbar. Die Aussagekraft ist für den Vergleich der gesamten Gruppen statistisch gering, weil die Gruppen klein sind und eine große Streuung der Ergebnisse innerhalb der Gruppen vorliegt. Daher kann für die untersuchten Tiere keine Aussage darüber getroffen werden, ob Biotin zu einer Beschleunigung und/oder Verbesserung der Wundheilung führt.

*Hochstetter (1998)* untersuchte den Einfluss von Biotin auf den klinischen Zustand gesunder Klauen der Vorder- und Hintergliedmaßen in einem Milchviehbestand und fand einen deutlichen Unterschied zwischen der Biotin- und der Kontrollgruppe bezüglich der Entwicklung des klinischen Zustandes der Hinterklauen im Verlauf des Versuches. Die Untersuchung der Vorderklauen hingegen ergab keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Untersuchungen von *Hochstetter (1998)* erfolgten an gesunden Klauen und unter Feldbedingungen. In der vorliegenden Untersuchung liegen aufgrund der Wundheilung jedoch pathologische Verhältnisse vor, die eine mögliche positive Wirkung von Biotin auf die Epidermis vermutlich überdecken. Dabei spielt nicht nur eine einwandfreie Beschaffenheit der Epidermis eine Rolle, sondern auch die Dermis muss ihrer Ernährungsfunktion uneingeschränkt nachkommen können, um den Stofftransport von der Lederhaut in die Epidermis zu gewährleisten. Die starken individuellen Unterschiede der Wirkung von Biotin auf den Heilungsverlauf können dadurch erklärt werden, dass die beschriebenen Störungen in der Mikrozirkulation verhindern, dass Biotin in ausreichender Konzentration in das Zielgewebe (Epidermis) gelangt.

In ihren Untersuchungen über mögliche Einflüsse von Biotin auf die Heilung von Klauengeschwüren beim Rind konnten schon vorher *Hunkeler (1996)* und *Koller (1998)* keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Biotin- und Kontrolltieren in der Heilung feststellen. Dieses wird durch die eigenen statistischen Ergebnisse bestätigt. Biotin hat nach den lichtmikroskopischen Untersuchungen dieser Autoren zufolge auch keinen maßgeblichen Einfluss auf die Hornwachstumsrate, sondern in erster Linie auf die Verbesserung der Hornqualität.

Diese Arbeit zeigt, dass erwünschte positive Effekte von Biotin oder anderen Supplementen durch Einflüsse, die eine leistungsfähige Durchblutung des Gewebes stören, verhindert werden können.