

Segmentspezifitäten am Pferdehuf - Teil I: Struktur- und Funktionsvarianten

Klaus-Dieter Budras¹ und Bianca Patan²

Institut für Veterinär-Anatomie¹, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und Klinik für Orthopädie bei Huf- und Klauentieren der Veterinärmedizinischen Universität Wien²

Zusammenfassung

Hornproben aus allen Hufsegmenten von fünfzehn Warmblutpferden (*Equus caballus*) und zehn Przewalskipferden (*Equus ferus przewalskii*) wurden transmissions- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Hornmassen aus den verschiedenen Hufsegmenten weisen zahlreiche Form- und Strukturvarianten auf, die an segmentspezifische Funktionen geknüpft sind. In den Blättchenhornzellen des Wandsegmentes liegen parallel angeordnete Hornbälkchen vor, die aus Keratinfilamenten und ummantelnden Keratinfilament-assoziierten Proteinen (KFAP) bestehen und durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Dagegen sind im Röhrenchorn dreidimensional angeordnete Hornbälkchen erkennbar, die Druckkräften aus verschiedenen Richtungen standhalten. Die Blättchenhornzellen und die Röhrenchornzellen der inneren Kronhornschicht sind schwammartig geformt und speichern in ihren vorgeformten spongiösen Hohlräumen Wasser. Außerdem erfolgt eine diffuse Wasserspeicherung an den Hornzellbestandteilen, nämlich an Zytokeratinen, KFAP und Interzellularkitt. Eine dritte Speicherform überwiegt im Saumhorn, wo Wassertröpfchen im Interzellularspalt gebunden werden. Daraus resultiert ein beachtliches Wasseraufnahmevermögen mit 71,36 prozentigem Wassergehalt bei maximaler Wassersättigung. Der unterschiedliche Wassergehalt beeinträchtigt die Horneigenschaften (Härte, Festigkeit und Elastizität) sowie die Hornqualität in hohem Maße.

Schlüsselwörter: Struktur- und Funktionsvarianten der Hornzellen, Wasserspeicherung, Horneigenschaften

Segment-related specificities of the equine hoof - Part I: Structural and functional variants

Horn samples from all segments of the hoof of fifteen warm blooded horses (*Equus caballus*) and ten Przewalski horses (*Equus ferus przewalskii*) were examined transmission and scanning electron microscopically. The horn masses from the different hoof segments showed numerous variations regarding form and structure which were related to segment-specific functions. The lamellar horn cells from the wall segment displayed parallel horny trabeculae consisting of keratin filaments coated by keratin filament associated proteins (KFAP) and linked by disulfide bonds. In the horny tubules, on the other hand, three-dimensional arrangement of horny trabeculae is discernible in order to withstand pressure forces from different directions. The lamellar horn cells and the tubular horn cells of the inner coronary horn layer appear spongiform and contain water in their precast excavations. Additionally, a diffuse water storage takes place at the different horn cell components (cytokeratins, KFAP and intercellular cementing substance). A third manner of water storage prevails in the periopic horn where water droplets are bound in the intercellular cleft. This results in a considerable water binding capacity of 71,36 % water content at maximum water saturation. The differing water content greatly influences the mechanical capacities of the horn (hardness, firmness and elasticity) as well as the horn quality.

Key words: structural and functional variants of horn cells, water storage, horn characteristics

Einleitung

Hufhorn besteht aus toten Hornzellverbänden, die durch Keratinisierung und Verhornung aus lebenden Epidermiszellen hervorgegangen sind. Die Differenzierungsvorgänge führen während der Keratinisierungsphase zur Synthese des keratinen Rohmaterials, und die anschließende Verhornung beginnt bei Eintritt des programmierten Zelltodes mit einer inneren Zellaushärtung. Dabei kommt es zur Interaktion der Rohmaterialien und zwar der Keratinfilamente mit den ummantelnden Keratinfilament-assoziierten Proteinen (KFAP), die u.a. über Disulfidbrücken stabilisiert werden (Frohnes und Budras 2001). Die interzelluläre Adhäsion, die Verbindung zu stabilen Hornzellverbänden, wird durch den Interzellularkitt (membrane coating material) bewirkt, der vom rauhen endoplasmatischen Retikulum und vom Golgi-Apparat gebildet wird. Die Synthese ist als bemerkenswerte biologische Leistung einer absterbenden Zelle zu bewerten. Der Interzellular-

larkitt gelangt in Kittvesikel, die zum geringen Teil in der Zelle verbleiben und zum größeren Teil ihren Inhalt in den Interzellularspalt ausschleusen (Anthauer 1996). Der Anteil des Interzellularkittes an Glycoproteinen bewirkt die interzelluläre Adhäsion, die Hauptfunktion im Hufhorn. Der Anteil an Lipiden bildet eine semipermeable Barriere gegen unkontrollierten Aus- und Eintritt von Wasser (und mitgeführten Mikroorganismen) aus bzw. in den Organismus, und der Anteil an Enzymen löst intrazelluläre Zellorganellen (z. B. Mitochondrien) und interzelluläre Strukturen (z. B. Desmosomen) auf. Schließlich bildet sich am Ende der Verhornung eine Verstärkung an der Zellmembran. Dieses marginale Band (cornified envelope) verleiht der Zelle mechanischen Schutz und gilt als sehr wirksame Abgrenzung gegen mikrobielle Invasionen.

Die einheitlichen Differenzierungsprozesse mit segmentaler Modifikation bringen unterschiedlichste Formvarianten hervor, deren funktionelles Äquivalent noch weitgehend im Dun-

keln liegt und in der vorliegenden Studie aufgeklärt werden soll. Morphologische Eigentümlichkeiten der unterschiedlichen Hornzellverbände wie intra- und interzelluläre Hohlräume und Mikropalten gehen bei unphysiologischen Ausmaßen nahtlos in dyskeratotische (pathologische) Veränderungen über. Die Abgrenzung normaler Gegebenheiten von krankhaften Veränderungen ist deshalb eine vornehmliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Desweiteren sollen Hornstruktur samt Hornqualität der Przewalskipferde und die der Hausperde (Warmblutperde) verglichen werden. Da die Przewalskipferde als heute noch lebende Vorfahren unserer Hausperde gelten, können Rückschlüsse über den Einfluss von Genetik, Umwelt und Zuchtauswahl auf die Hornqualität durchaus aufschlussreich sein.

Mit strukturellen Untersuchungen des vorliegenden 1. Teils soll in Korrelation mit physikalisch-mechanischen Messungen des nachfolgenden 2. Teils (Patan und Budras 2003, Druck in Vorbereitung) unserer Untersuchung eine Synthese von Struktur und Funktion der Hornzellverbände erarbeitet und so eine Grundlage für weiterführende klinische Studien geschaffen werden. Die Untersuchungen werden mit einer neuentwickelten Nativmethode zur Herstellung von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie durchgeführt (Budras et al. 2002a), um bei Verzicht auf Kunstharzeinbettung und Fixierung unter Vermeidung von Lösungsmitteln Artefakte auszuschließen und die erhobenen Befunde zweifelsfrei deuten zu können. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Struktur der Hornzelle, da der Interzellularkitt bereits von Anthauer (1996) speziell untersucht wurde.

Material und Methoden

Die Hornproben in einer Größe von 2x2x10 mm stammen ausschließlich von Stuten im Alter von 6-10 Jahren und zwar von 10 Przewalskipferden und 15 Warmblutperden. Die Proben wurden aus dem Saum-, Kron-, Wand-, Sohlen-, Strahl und Ballensegment entnommen und für die Transmissionselektronenmikroskopie nach der Nativ-Präparationsmethode bearbeitet (Patan 2001; Budras et al. 2002a). Ohne weitere Vorbehandlung wurden „Nativschnitte“ angefertigt, deren Schnittebene senkrecht zum Verlauf der Hornröhrchen lag.

Dazu wurden an einem Ultramikrotom mit einem Diamantmesser 90 nm dicke Ultradünnschnitte hergestellt. Nach dem Auffangen der Schnitte auf befilmten Kupfernnetzen wurde abschließend in einem Ultrastainer eine Schnittkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat nach der Methode von Venable und Coggeshall (1965) durchgeführt. Die Auswertung der Ultradünnschnitte und die fotografische Befunddokumentation erfolgten an einem Transmissionselektronenmikroskop des Typs EM 10 CR (Fa. Zeiss, Oberkochen).

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden Hornproben in einer Größe von 10x10x10 mm von allen Hufsegmenten entnommen und nach gerichtetem Gefrierbruch (Patan 2001) routinemäßig weiter verarbeitet. Dabei wurden die in Glutaraldehyd (3%ig) und Osmiumtetroxid (1%ig) fixierten Präparate gründlich in Phosphatpuffer gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Substitution des Alkohols wurden die Proben anschließend für 18 Stunden in Hexamethyldisilazan verbracht, das nachfolgend durch 72-stündiges Abdampfen aus den Proben entfernt wurde. Die getrockneten Präparate wurden mittels Leit C nach Göcke (Fa. Plano, Marburg) auf kleine Aluminiumteller geklebt und in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polarion, Watford/England) mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm besputtert. Die Untersuchung und fotografische Befunddokumentation erfolgten am Rasterelektronenmikroskop Nanaolap2000 (Fa. Bausch u. Lomb, Kanada).

Eigene Befunde

Nachfolgend werden die Architektur der Hornzellen und deren Strukturelemente wie die Keratinfilamente und die Keratinfilament-assoziierten Proteine (KFAP) sowie die interzellulären Kittsubstanzen berücksichtigt.

Keratinfilamente vom Intermediärtyp mit einem Durchmesser von ca. 8 nm sind zwischen den einzelnen Filamenten und viel deutlicher zwischen den Filamentbündeln mit Keratinfilament-assoziierten Proteinen (KFAP) ummantelt. Die Keratinfilamentbündel und das eingeschlossene sowie ummantelnde KFAP bilden zusammen Hornbälkchen mit einem Durchmesser von ca. 0,5µm. Die Hornbälkchen mittlerer Elektronendichte sind bei annähernd longitudinaler paralleler Ausrich-

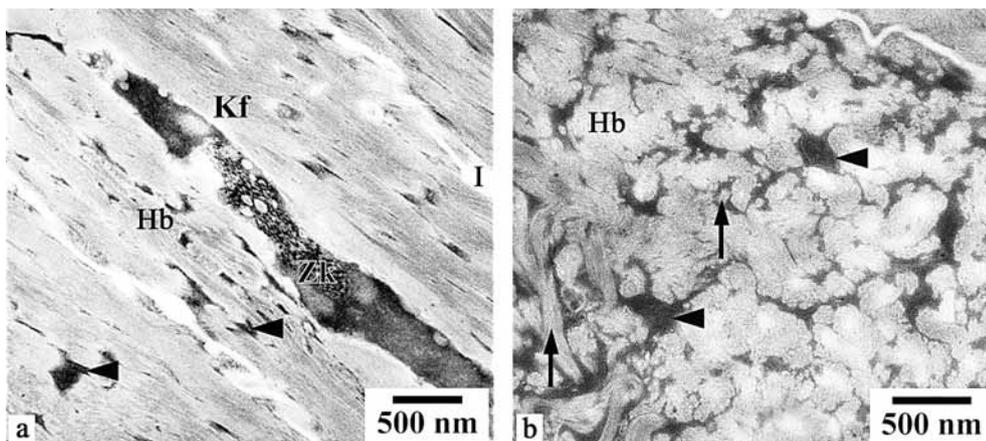


Abb 1 Transmissionselektronenmikroskopische Bilder von Hornzellen aus dem äußeren Kronhorn. Abb. 1a: Längsangeschnittene Röhrchenrindenzellen mit erhalten gebliebenem Zellkern (ZK). Hornbälkchen (Hb) mit enthaltenen Keratinfilamentbündeln sind längs angeordnet und von bizarren elektronendichten Arealen aus KFAP (Pfeilkopf) flankiert, die stellenweise an die Zellgrenze heranreichen. I: Interzellularspalt. Abb. 1b: Quergetroffene Zwischenröhrchenhornzelle mit außergewöhnlich hohem Anteil von KFAP (Pfeilkopf), die Hornbälkchen (Hb) umgrenzen.

kopf), die Hornbälkchen (Hb) umgrenzen.

Fig. 1: Transmission electron microscopic pictures of horn cells from the outer coronary horn. Fig. 1a: Longitudinal section of tubular cortical cells with preserved cellular nucleus (ZK). Keratin filament bundles containing horny trabeculae are orientated lengthwise and flanked by bizarre electron-dense areas of KFAP (arrow head) which partly approximate the cellular border. I: intercellular cleft. Fig. 1b: Cross sectioned intertubular horn cell with an exceptionally high contingent of KFAP (arrow head) demarcating horny trabeculae (Hb).

Abb 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Hornbälkchen. Abb. 2a: Inneres Kronhorn mit Röhrenmarkzellen bei dreidimensionaler Anordnung der Hornbälkchen (Pfeilkopf). Die dazwischenliegenden (dunklen) KFAP-Anteile und die schattenhaften Reste der Zellkerne (ZK) wurden durch Lösungsmittel während der Fixierungs- und Einbettungsprozedur herausgelöst. Abb. 2b: Blättchen-Hornzellen mit paralleler Anordnung der Hornbälkchen (Pfeilkopf), die durch seitliche Scherkräfte abstrahlen. Z: Zellgrenze

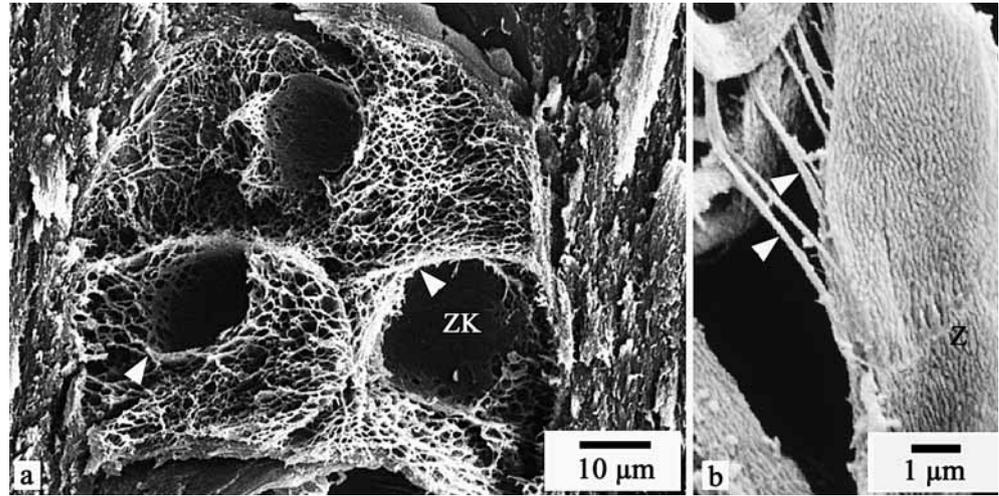


Fig. 2: Scanning electron microscopic pictures of intracellular horny trabeculae. Fig. 2a: Inner coronary

horn with tubular medullar horn cells displaying three-dimensional arrangement of horny trabeculae (arrow head). The inter-spaced (dark) KFAP contingent and the shadowy remains of nuclei (ZK) were dissolved by solvents employed during the fixation and embedding processes. Fig. 2b: Lamellar horn cells with parallel arrangement of horny trabeculae (arrow head) diverting under the influence of lateral shear stress. Z Cellular border

tion im äußeren Kronhorn und im Blättchenhorn seitlich von elektronendichtem unregelmäßigem Material flankiert, das aus purem KFAP – ohne Keratinfilamente – besteht (Abb. 1a). Auf dem Querschnitt lassen sich die helleren Hornbälkchen leicht von den umgebenden dunklen KFAP-Arealen unterscheiden (Abb. 1b). In wenigen Hornzellen sind die KFAP-Areale gegenüber der Umgebung wesentlich zahlreicher, umfangreicher und deutlicher.

Im rasterelektronenmikroskopischen Bild vom Blättchenhorn (Abb. 2b) ist erkennbar, dass die longitudinal ausgerichteten Hornzellen bei schräger (unphysiologischer, inadäquater) Zugrichtung aufspießen, indem Hornbälkchen seitlich abscheren, während sie bei longitudinaler (physiologischer, adäquater) Zugrichtung einer starken Zugbelastung standhalten. Die dreidimensionale Ausrichtung der Hornbälkchen und Keratinfilamentbündel, die in allen Hufarealen mit ausgeformten Hornröhren vorkommt (Abb. 2a), ist zur Abfederung dreidimensionaler Kräfte geeignet.

Die Hornzellen im Blättchenhorn des Wandsegmentes und in der Röhrenrinde des inneren Kronhorns weisen eine spon-

giforme (schwammige) Konfiguration auf (Abb. 3a und 3b). Die spongiösen, mit Wasser gefüllten Hohlräume, entstehen während des Verhornungsprozesses in den Arealen aus purem KFAP. Im Zentrum dieser KFAP-Areale bildet sich ein optisch leerer Wassertropfen, der bei stetiger Vergrößerung das elektronendichte KFAP-Material an den Rand drängt. So entstehen bizarre Hohlräume mit einem Durchmesser bis zu 3 µm, die von Hornbälkchen eingerahmt sind. Die spongiösen Hohlräume stehen mit dem kittgefüllten Interzellularspalt in Verbindung (Abb. 3b). Größere Hornbälkchen umrahmen nukleäre Hohlräume (Lakunen), die bei einem Durchmesser bis zu 15µm durch Auflösung der Zellkerne entstehen (Abb. 3a). Ein bemerkenswerter Unterschied ist diesbezüglich zwischen Haus- und Urwildpferden festzustellen. Die Zellkerne sind bei Przewalskipferden viel beständiger und können auch in älteren Hornmassen des äußeren Kronhorns noch lange nach der Verhornung und dem damit einhergehenden programmierten Zelltod als abgestorbene elektronendichte Einschlüsse nachgewiesen werden (Abb. 1a).

Gemäß der geringen mechanischen Belastbarkeit sind weitgehend elektronendurchlässige (helle) Zellen, wie sie im

Abb 3a Rasterelektronenmikroskopisches Bild von spongiiformen Hornzellen der Röhrenrinde. Die spongiösen Räume (weiße Sternchen) sind durch geflechtartig angeordnete Hornbälkchen (Pfeilkopf) abgegrenzt. Schwarze Sternchen: Nucleäre Hohlräume, die durch herausgelöste Reste der Zellkerne entstanden sind. Pfeil: Undifferenzierte Hornzellen des Zwischenröhrenhorns.

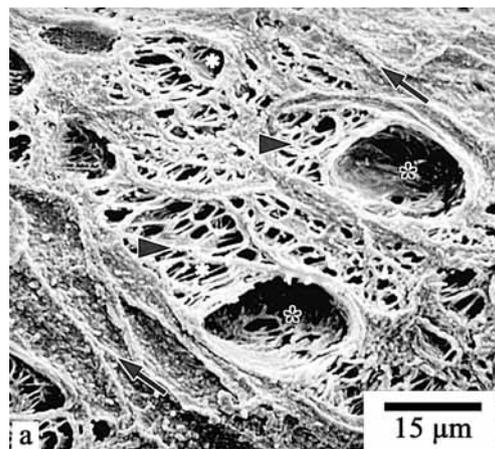


Abb 3b Transmissionselektronenmikroskopisches Bild von spongiösen Räumen (Sternchen), die sich in den KFAP-Arealen (Pfeilkopf) ausweiten und stellenweise mit dem kittgefüllten Interzellularspalt (I) in Verbindung stehen (x).

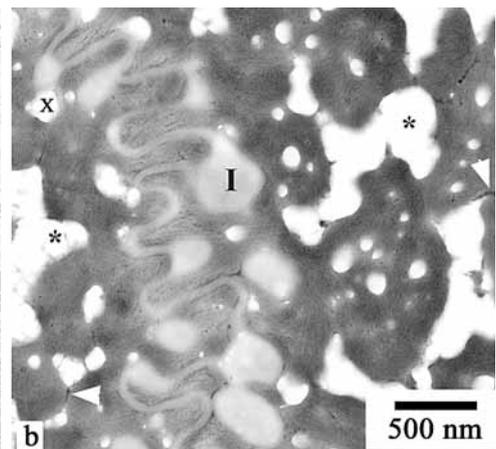


Fig. 3a: Scanning electron microscopic picture of spongiiform horn cells of the tubular cortex. The spongy areas (white asterisks) are demarcated by braid-like arranged horny trabeculae (arrow head). Black asterisks: Nuclear excavations resulting from dissolution of nuclei remains. Arrow: undifferentiated horn cells of the intertubular horn. Fig. 3b: Transmission electron microscopic picture of spongy excavations (asterisks) which enlarge in the KFAP-areas (arrow head) and partially associate with (x) the cementing-substance-filled intercellular cleft (I).

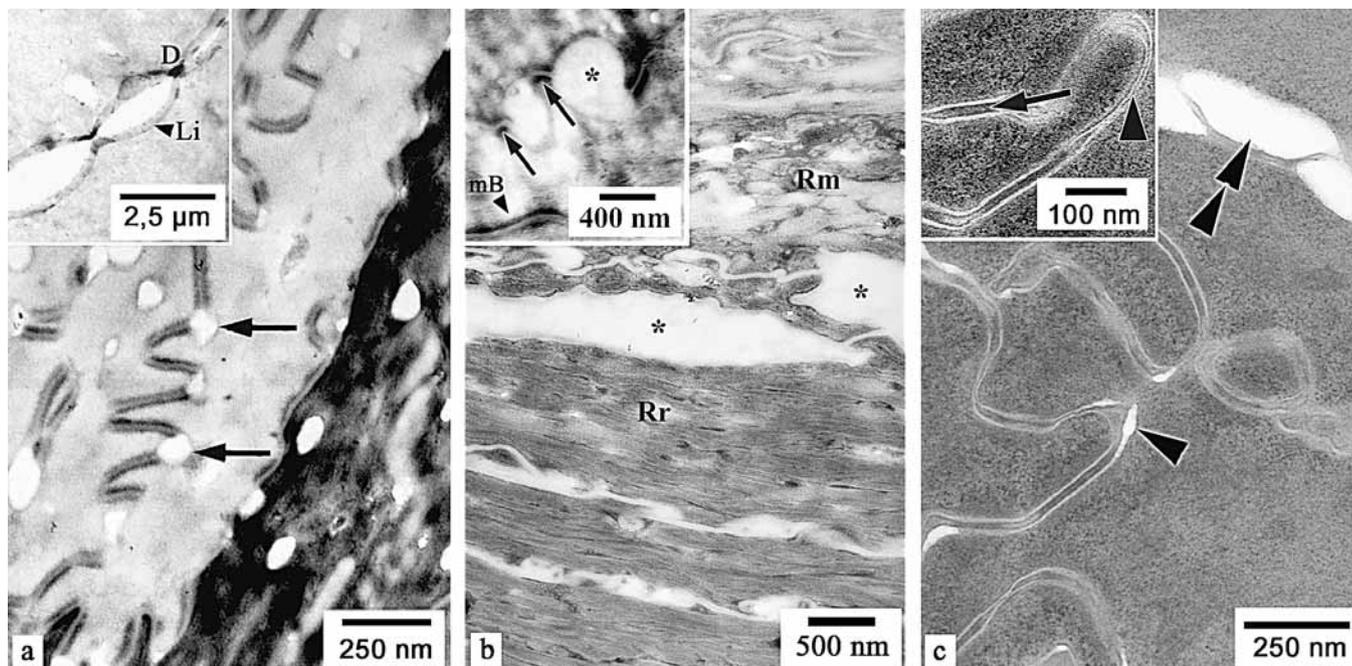


Abb 4 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen vom Interzellularraum. **Abb. 4a:** Grenze zwischen heller Saumhornzelle (links) und dunkler äußerer Kronhornzelle (rechts). Der Interzellularraum ist durch elektronenleere Wassertropfen (Pfeile) stellenweise erweitert. Der Bildeinsatz zeigt drei hintereinander gereihe Wassertropfen, die durch Desmosomenreste (D) abgegrenzt sind und von lipidhaltigem Interzellularkitt (Li) eingerahmt sind. **Abb. 4b:** Grenze zwischen Röhrenrinde und Röhrenmark. Zwischen Röhrenmark (Rm) und Röhrenrinde (Rr) ist der Interzellularraum häufig lakunär erweitert und mit Interzellularkitt angefüllt, der sehr feinkörniges Material mittlerer Elektronendichte enthält (Stern). Bildeinsatz: Der Interzellularraum zwischen den Markzellen weist in allen drei Kronhornzonen zahlreiche blasenartige Erweiterungen auf, die mit sehr großen Mengen eines fein- bis grobkörnigen, teilweise flockigen Interzellularkittes mittlerer bis geringer Elektronendichte angefüllt sind (Stern). Diese Erweiterungen werden häufig von Desmosomen flankiert (Pfeil). Die Hornzellmembran ist durch das marginale Band (mB) um das Doppelte verdickt. **Abb. 4c:** Im „Sommerhorn“ entstehen an der elektronendurchlässigen hellen modifizierten Zellmembran zwischen Hornzellen und Interzellularkitt zunächst Ultrarisse (Pfeilkopf), die sich zu Mikrorissen (Doppelpfeilkopf) ausweiten. Bildeinsatz: In allen drei Kronhornzonen sind insbesondere im Zwischenröhrenhorn Verengungen des Interzellularrisses in Form von gap junctions ausgebildet (Pfeilkopf). In unmittelbarer Nähe der gap junctions finden sich häufig Desmosomen bzw. Reste dieser Zellverbindungen (Pfeil).

Fig. 4: Transmission electron microscopic pictures of the intercellular cleft. Fig. 4a: Borderline between light perioplic horn cell (left) and dark outer coronary horn cell (right). The intercellular cleft is in part enlarged by electron-void water droplets (arrows). The insert depicts three water droplets in a row which are demarcated by desmosome remains and lined by lipid-containing intercellular cementing substance (Li). Fig. 4b: Borderline between tubular cortex and tubular marrow. The intercellular cleft in-between tubular marrow (Rm) and tubular cortex (Rr) is often dilated and filled with accumulations of intercellular cementing substance which contains fine granular material of middle electron density (asterisk). Insert: In all three coronary horn zones, the intercellular cleft between the medullar cells displays numerous vesicular enlargements filled with large masses of fine to coarse granular, in part even flaky intercellular cementing substance of middle to low electron density (asterisk). These enlargements are often flanked by desmosomes (arrow). The thickness of the horn cell membrane is doubled by formation of a marginal band (mB). Fig. 4c: In "summer horn", ultra-ruptures (arrow head) are initially developed at the electron permeable, modified cell membrane between horn cells and intercellular cementing substance which are then enlarging and form micro-fissures (double arrow head). Insert: All three coronary horn zones display constrictions of the intercellular cleft in the form of gap junctions (arrow head), particularly in intertubular horn. In close proximity of these gap junctions, desmosomes respectively the remains of these intercellular junctions (arrow) are detectable.

Saumhorn und im Röhrenmark typisch sind (Abb. 4a und 4b), arm an Ausgangsmaterial für die Verhornung. Die vergleichsweise spärlichen Keratinfilamente und die KFAP-Anteile sind durch eine geringe Dichte an Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Im Röhrenmark ist die Verknüpfung des Ausgangsmaterials für die Verhornung über Disulfidbrücken stellenweise so schwach, dass KFAP durch Lösungsmittel herausgelöst sind und lediglich das „nackte“Keratingerüst erhalten bleibt (Abb. 2a). Dagegen sind stark strapazierbare Hornzellverbände, wie das äußere Kronhorn, auffallend elektronendicht (dunkel), wodurch ihr Reichtum an Hornbestandteilen und deren intensive Verbindung über Disulfidbrücken zum Ausdruck kommt (Abb. 4a, rechts). In einigen Hornstrukturen, wie z. B. im Blättchenhorn und in der inneren Lage der Röhrenrinde, erfahren die Zellen während der Verhornung einen deutlichen Formwandel, indem sie sich beim nun erfolgenden Umbau des Zytoskeletts aus Keratinfilamenten abflachen und dabei eine schuppenförmige Gestalt annehmen.

Dagegen bleibt im Röhrenmark und im Zwischenröhrenhorn die annähernd kubische oder quadratische Zellform auch nach der Verhornung erhalten (Abb. 2a).

Die Hornzellen aller Hufsegmente weisen direkt unter der Oberfläche ein marginales Band (cornified envelope) auf, das bei mittlerer Elektronendichte in den meisten Hornzellen eine Breite von 10-15 nm und damit etwa die Stärke einer Hornzellmembran aufweist (Abb. 4b, Bildeinsatz). Besonders deutlich tritt das marginale Band im Bereich von Desmosomenresten in Erscheinung. Dagegen ist es in direkter Nachbarschaft von Hornbälkchen mit enthaltenen Keratinfilamentbündeln eher undeutlich, weil „maskiert“, da beide Strukturen (das marginale Band und KFAP-Anteile) eine ähnliche Elektronendichte aufweisen. Mit zunehmender Hornzellalterung wird das marginale Band undeutlicher. Im Blättchenhorn tritt das marginale Band an den ungewöhnlich großen Blättchenhornzellen, die eine enorme Länge von ca. 100 µm aufweisen,

nur sehr undeutlich als dünnes Band von nur 4 nm Breite in Erscheinung.

Der Interzellularkitt (Abb. 3b) weist in den verschiedenen Hufsegmenten bei unterschiedlicher Struktur eine segmentspezifische Zusammensetzung auf. Er füllt in einigen Segmenten, wie im Kronhorn und im Blättchenhorn, die Interzellularrspalten, einschließlich der blasigen Erweiterungen vollständig, und in anderen Segmenten, wie im Ballenhorn, nur unvollständig (partiell) aus. Im Saumhorn liegen interzelluläre Wassertropfen mit einem Durchmesser von mehreren μm vor, die vom lipidhaltigen Interzellularkitt eingerahmt sind (Abb. 4a, Bildeinsatz).

Reste von Zellverbindungsstrukturen in Form von Desmosomen und Nexus sind Überbleibsel aus lebenden Epidermiszellen, die nach der Verhornung in den abgestorbenen Hornzellen noch schattenhaft erkennbar sind, besonders im Kronhorn (Abb. 4c, Einsatz). Für die Zellkommunikation und die Zelladhäsion dürften sie nach der Verhornung und dem programmierten Zelltod in ihrer Bedeutung stark gemindert sein, weil diese ursprünglichen Zellfunktionen an lebende Zellen gebunden sind, und interzelluläre Zusammenhangstrennungen (Mikrorisse) durch diese Überbleibsel an Zellverbindungsstrukturen nur anfangs eingeschränkt werden. Zwischen dem Interzellularkitt im Interzellularrspalt und der Hornzelloberfläche liegt eine auffallend helle (elektronendurchlässige) strichförmige Abgrenzung vor (Abb. 4c), die modifizierte Zellmembran. Diesem Grenzbereich kommt im Horn, das während der Sommermonate gebildet wird, eine besondere Bedeutung für die Entstehung von Ultra- und Mikrorissen zu (Abb. 4c). Das gilt besonders für Przewalskipferde und weniger deutlich auch für Hausperde. Durch Auflockerung, Verbreiterung und Separierung entstehen im Bereich der Zelladhäsionsmoleküle zunächst winzige, unscheinbare Ultrarisse, die sich zu größeren Mikrorissen und schließlich zu makroskopisch erkennbaren Hornrissen ausweiten können.

Diskussion

Zur objektiven Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Struktur und Funktion sind geeignete Untersuchungsmethoden von ausschlaggebender Bedeutung. Die Struktur lässt sich in idealer Weise durch die hier angewandte Kombination von transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Techniken ermitteln. Mit erstgenanntem Transmissionsverfahren können alle strukturellen Details bis hin zur Molekularstruktur zweidimensional erfasst werden. Der unzureichende Überblick bei nur wenige Quadratmillimeter großen Untersuchungsobjekten lässt sich durch die rasterelektronenmikroskopische Technik ausgleichen, denn die beachtliche Größe der Proben bis zu einem Kubikzentimeter ermöglicht einen ausreichenden dreidimensionalen Gesamtüberblick. Die angewandte Nativmethode zur Herstellung transmissionsmikroskopischer Ultradünnschnitte (Budras et al. 2002a) ist deshalb besonders geeignet, weil Fixierungs- und Einbettungsartefakte durch Verzicht auf Lösungsmittel ausgeschlossen sind, was beispielsweise die Beurteilung leichtlöslicher Hornbestandteile, wie der lipidhaltigen Kittsubstanz des Interzellularrspaltes, wesentlich erleichtert (Patan 2001).

Wie die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung vermittelt, sind die Hauptbestandteile der meisten Hornzelltypen,

die Keratinfilamente, trajektorieell in bestimmte Richtungen orientiert und zwar parallel zur Druck- und Zugbelastung. Eine einseitig ausgerichtete Zugwirkung lässt sich an der parallelen Ausrichtung der Hornbälkchen mit enthaltenen Keratinfilamentbündeln ablesen. Die daraus resultierende enorme Zugbelastbarkeit des Blättchenhorns im Wandsegment ist eine Voraussetzung für die Funktion des Hufbeinträgers (Budras und Huskamp 1999). Bei Materialprüfungen an Hornmassen ist die trajektorielle Ausrichtung der Keratinfilamente zu berücksichtigen, um repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Belastbarkeit ist abhängig von quantitativen und qualitativen Parametern bezüglich der Hornzellbestandteile. Eine hohe Belastbarkeit, z. B. des äußeren Kronhorns, ist an eine große qualitative Vielfalt an Keratinfilamenten mit verschiedenen Molekulargewichten geknüpft, die elektrophoretisch und immunhistologisch durch Markierung mit Immunogold bestimmbar sind (Budras et al. 2002a). Der ebenso bedeutsame quantitative Anteil (die Gesamtzahl der Keratinfilamente) verhält sich proportional zur Elektronendichte der betreffenden Hornzellen. Die hell erscheinenden leicht zerfallenen Hornzellen des Röhrchenmarks und des Saumhorns sind in qualitativer und quantitativer Hinsicht arm an Keratinfilamenten (Patan 2001).

Der qualitative und quantitative Anteil an der KFAP-Fraktion lässt sich morphometrisch nur auf dem elektronenmikroskopischen Bild ermitteln. Die übermäßige Anhäufung von KFAP-Arealen in einigen Hornzellen kann als Ausdruck unzureichender Interaktion und Durchmischung der Hornzellbestandteile und damit als unvollständige Verhornung gewertet werden, die eine Stabilitätsminderung der Hornzellverbände verursacht. Die Dichte an Disulfidbrücken, die sich durch semiquantitative histochemische Methoden ermitteln lässt (Barnett und Seligmann 1952), wächst proportional zur mechanischen Belastbarkeit der betreffenden Zellen. Die kovalenten Bindungen über Disulfidbrücken sind besonders zwischen high-sulfur Proteinen ausgeprägt, die durch einen hohen Gehalt an der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein gekennzeichnet sind. Diese Aminosäure wird mit der Nahrung aufgenommen und fördert durch die Entstehung von Disulfidbrücken wesentlich die Bildung der stabilen und festen Struktur des Hornzellverbandes im harten Hufhorn, wie beispielsweise im Kronhorn (Grosenbaugh und Hood 1992; Steinert et al. 1984). Auch das marginale Band (cornified envelope) ist durch die Verstärkung der Hornzellmembran ein weiterer mechanischer Stabilisierungsfaktor, der zusätzlich als Barriere gegen mikrobielle enzymatische Einflüsse fungiert (Reichert et al. 1993). In den besonders großen Blättchenhornzellen des Wandsegmentes ist diese Barriere unterentwickelt, weil ein bestimmter Anteil an Proteinen des marginalen Bandes im Zuge der enormen Zellvergrößerung während der Verhornung (Budras et al. 1989) auf eine sehr große Zelloberfläche verteilt wird. Da die Blättchenhornzellen beim Distalschub am Tragrand an der Bildung der weißen Linie (Zona alba) beteiligt sind, ist die mangelnde Ausprägung ihrer antimikrobiellen Barriere als wichtiger Faktor bei der White line disease, der mikrobiellen Zersetzung der Weißen Linie, in Betracht zu ziehen (Redden 1990).

Die Wasserspeicherung erfolgt einerseits diffus an Zytokeratinen und KFAP (Budras et al. 2002b) sowie am Interzellularkitt (Anthauer 1996; Mülling 1993) und lässt sich elektronenmikroskopisch nicht exakt lokalisieren, wohl aber durch physi-

kalische Messmethoden belegen (Patan und Budras 2003, Druck in Vorbereitung). Andererseits besitzen bestimmte Hornzellen vorgeformte und gut wahrnehmbare Strukturelemente für eine Wasserspeicherung, die entsprechend den funktionellen Erfordernissen in den verschiedenen Hufsegmenten unterschiedlich ausgeprägt sind. So lassen die Hornzellen des Saumsegmentes durch interzelluläre tropfenförmige Wasseraufnahme einen speziellen Speichermechanismus erkennen (Budras et al. 2002b), der wesentlich effektiver ist als die „diffuse“ Wasserspeicherung. Die gespeicherten Wassertropfen werden vom lipidhaltigen Interzellularkitt umschlossen (Anthauer 1996). Die Wasseraufnahme geht mit stetiger Vergrößerung der Wassertropfen und der Aufquellung der gesamten Hornmasse sowie einer signifikanten Abnahme der Gewebestabilität einher (Budras et al. 2002b).

Verschiedene Hornzelltypen des Blättchenhorns der Wand und der Röhrchenrinde des inneren Kronhorns und des Ballen-Strahlhorns (Frohnes 1999) treten als Spongiokorneozyten (schwammartige Hornzellen) in Erscheinung und lassen eine Wasserspeicherung in vorgeformten spongiösen Hohlräumen erkennen, die entgegen anderslautender Literaturangaben nicht artifiziell entstanden sind. Wie die eigenen Befunde und die diesbezügliche Beschreibung von Kempson und Campell (1998) nahelegen, stehen die wassergefüllten spongiösen Hohlräume der Spongiokorneozyten mit dem Interzellularkitt in Verbindung, so dass der Flüssigkeitsabtransport zur Befeuchtung der außen anliegenden Hornmassen durch den Interzellularkitt reguliert werden kann (Mülling 1993). Die permanent mit Wasser gefüllten spongiösen Hohlräume verleihen dem spongiösen Horngewebe eine Turgoreigenschaft, was Pollitt (1999) eindrucksvoll mit einer Videopräsentation belegen konnte. Diese Eigenschaft vermittelt dem Ballen- und Strahlhorn eine Stoßdämpferfunktion zur Abfederung vertikaler Druckkräfte und dem Wand- und inneren Kronhorn die Fähigkeit zur elastisch-abfedernden Verankerung des Hufbeinträgers (Budras und Huskamp 1999), dessen trajektorieell ausgerichtete spongiöse Blättchenhornzellen des Wandsegmentes bei linearer Hintereinanderreihung die ebenfalls spongiösen inneren Kronhornröhrchen umwickeln. Die Spongiokorneozyten sind bei trajektorieeller Anordnung ihrer Hornbälkchen durch die dazwischenliegenden wassergefüllten spongiösen Räume nach dem Prinzip der Leichtbauweise geformt, die in vergleichbarer Weise auch der Substantia spongiosa langer Röhrchenknochen eigen ist. Durch die spongiösen Hohlräume wird bei „Materialeinsparung“ die Stabilität der Hornzellen nicht beeinträchtigt, wohl aber deren Elastizität nach dem Bauprinzip unterkammerter Wasserkissen erhöht. Da die Spongiokorneozyten beim Distalschub bis zur Höhe der Hufbeinspitze in unmittelbarer Nähe zur „vollsaftigen“ gefäßversorgten Lederhaut verbleiben, trocknen sie nicht aus. Mit zunehmender Entfernung von der Lederhaut erfolgt jedoch distal der Hufbeinspitze ein zunehmender Austrocknungsprozess, der mit einer Schrumpfung der Spongiokorneozyten einhergeht. Daraus resultiert eine zunehmende Gewebespannung (Douglas et al. 1996; Kasapi und Gosline 1997) im Grenzgebiet zum mittleren Kronhorn. Nach physiologischen Tragandausbrüchen beim Przewalskipferd (Patan 2001) lassen die ausgebrochenen Hornchips durch Austrocknung und Schrumpfung ihres inneren Kronhorns eine deutliche Neigung zur Einrollung und eine Spaltbildung an der Grenze zwischen den drei Kronhornschichten erkennen, wodurch die Zusammenhänge zwischen Wassergehalt, Aus-

trocknung, Spannungserhöhung und Spaltenbildung offensichtlich werden. Der physiologische, maximale und minimale Wassergehalt in den verschiedenen Hornsegmenten und die unterschiedliche Geschwindigkeit der Wasseraufnahme sowie –abgabe und der daraus ableitbare Grad der Wasserbindung in den verschiedenen Hufsegmenten werden im 2. Teil zu dieser Untersuchung unterbreitet, siehe Patan und Budras (2003, Druck in Vorbereitung).

Der Interzellularkitt ist die wichtigste Strukturkomponente für den interzellulären Zusammenhalt, da die schattenhaften Überbleibsel an Desmosomen nach dem vorprogrammierten Zelltod im Zuge der Verhornung ihre ursprüngliche adhäsive Funktion mehr und mehr einbüßen. Der Adhäsionsmechanismus zwischen Interzellularkitt und der Hornzelloberfläche ist nicht vollständig geklärt, weil immer noch fraglich ist, ob die Befestigung des Interzellularkittes an der Hornzelloberfläche durch Adhäsionsproteine oder durch Lipide (Wertz et al. 1989) erfolgt. Die hier entstehenden physiologischen Ultrarisse und daraus hervorgehende Mikrorisse fördern im Horn, das während der Sommermonate gebildet wird, die Entstehung von physiologischen Tragandausbrüchen und tragen so bei natürlicher Haltung der Urwildpferde im Semireservat zur Selbstregulierung der Hufgröße bei (Budras et al. 2001; Patan 2001). Hornrisse können intrazellulär oder interzellulär beginnen. Die viel häufigeren interzellulären Risse, die zwischen dem Interzellularkitt und der Hornzelloberfläche entstehen, erscheinen deshalb gefährlicher, weil sie sich ohne größere Hindernisse leicht über Zellgrenzen hinaus verlängern können. Dagegen bleiben die intrazellulären Risse zunächst auf das Areal der betreffenden Zelle beschränkt. Ihre Ausdehnung ist bei paralleler Anordnung der Hornbälkchen leicht möglich. Dagegen wird die Ausweitung der Risse im Geflecht der dreidimensional angeordneten Hornbälkchen viel eher gestoppt. Aber selbst Mikrorisse, die nicht die Lederhaut erreichen, stellen eine Gefahr dar, da sie einer Invasion von Mikroorganismen den Weg bereiten. Bei weiterem mikrobiellem Vordringen unter Keratinolyse kann es sekundär zur äußerst schmerzhaften eitrigen Lederhautentzündung kommen.

Literatur

- Anthauer K (1996): Der segmentspezifische Aufbau des Interzellularkittes in der Hufepidermis des Pferdes. Vet. Med. Diss. Freie Universität Berlin
- Barnett R J und A M Seligmann (1952): Demonstration of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups by two new histochemical methods. J. Natl. Cancer Inst. 13, 215-216
- Budras K-D, R L Hullinger und W O Sack (1989). Light and electron microscopy of keratinization in the laminar epidermis of the equine hoof with reference to laminitis. Am. J. Vet. Res. 50, 1150-1160
- Budras K-D und B Huskamp (1999): Belastungshufrehe – Vergleichende Betrachtungen zu anderen systemischen Hufreheerkrankungen. Pferdeheilkunde 15, 89-110
- Budras K-D, B Patan und K Scheibe (2001): The horn of the hoof wall and the seasonal influence of the horn quality related to hoof diseases. In: H. HOFER (ed), Erkrankungen der Zootiere, Verlag: Forschungsverbund Berlin eV, 193-196
- Budras K-D, C Schiel, C Mülling und B Patan (2002,a): Method for preparing thin sections of untreated equine hoof horn for electron microscopic examination. Microsc. Res. Tech. 58, 114-120

- Budras K-D, B Patan und C Mülling* (2002,b): Raster- und transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen und physikalische Messungen zur Wasserbindungskapazität am Saumhorn des Pferdehufes. Wien. Tierärztl. Mschr. 89, 180-187
- Douglas J E, C Mittal, J J Thomason und J C Jofriet* (1996): The modulus of elasticity of equine hoof wall: Implications for the mechanical function of the hoof. J. Exp. Biol. 199, 1829-1836
- Frohnes A-K* (1999): Struktur, Verhornung und Hornqualität im Sohlen- und Ballen-Strahlsegment des Pferdehufes. Vet Med Diss, Freie Universität Berlin
- Frohnes A-K und K-D Budras* (2001): Endogene Einflußfaktoren auf die Hornqualität im Sohlen- und Ballen-Strahlsegment des Pferdehufes. Teil 2: Intra- und interzelluläre Faktoren. Pferdeheilkunde 17, 437-443
- Grosenbaugh D A und D M Hood* (1992): Keratin and associated proteins of the equine hoof wall. Am. J. Vet. Res. 53, 1859-1863
- Kasapi M A und J M Gosline* (1997): Design complexity and fracture control in the equine hoof wall. J. Exp. Biol. 200, 1639-1659
- Kempson S A und E H Campbell* (1998): A permeability barrier in the dorsal wall of the equine hoof capsule. Equine Vet. J. (Suppl.) 26, 15-21
- Mülling C* (1993): Struktur, Verhornung und Hornqualität in Ballen, Sohle und weißer Linie der Rinderklaue und ihre Bedeutung für Klauenerkrankungen. Vet Med Diss Freie Universität Berlin
- Patan B* (2001): Saisonaler Einfluss auf Hornbildungsrate, Hornabrieb und Hornqualität in der Hufwand von Przewalskipferden (*Equus ferus przewalskii*). Vet Med Diss Freie Universität Berlin
- Patan B und K-D Budras* (2003): Segmentspezifitäten am Pferdehuf. Teil II: Zusammenhang zwischen Hornstruktur und mechanisch-physikalischen Horneigenschaften in den verschiedenen Hufsegmenten. Pferdeheilkunde. Druck in Vorbereitung.
- Pollitt C C* (1999): The anatomy and physiology of the hoof wall. Proceedings of the 6th Congress of Equine Medicine and Surgery. 12.-14. Dezember 1999, Geneva (CH), 149-153
- Redden F R* (1990): White line disease. Equine Practice 12, 14-18.
- Reichert U, S Michel und R Schmidt* (1993): The cornified envelope. A key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: Darmon, M. und M. Blumenberg (Hrsg.): Molecular biology of the skin: The keratinocyte. San Diego, Academic Press, 107-150
- Steinert P M, D A D Parry, W W Idler, L D Johnson, A C Steven und D R Roop* (1985): Amino acid sequences of mouse and human epidermal type II keratins of Mr 67,000 provide a systematic basis for the structural and functional diversity of the end domains of keratin intermediate filament subunit. J. Biol. Chem. 260, 7142-7149
- Venable J H, und R Coggeshall* (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407-408
- Wertz P W, D C Swartzendruber, D J Kitko, K C Madison und D T Downing* (1989): The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. J. Invest. Dermatol. 93, 169-172

Prof. Klaus-Dieter Budras
Institut für Veterinär-Anatomie
Freie Universität Berlin
Koserstraße 20
14195 Berlin
budras@vetmed.fu-berlin.de