

## Bericht

Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchung der Hufhornstruktur nach Einwirkung des Hufklebepads 3M HVB.

### Fragestellung:

Gibt es durch das Aufbringen und Einwirken von *Primer Carré mix* oder *3M Universalprimer* mit anschließendem Aufkleben des Klebepads *3M HVB* für 6 Wochen einen Einfluss auf die Struktur bzw. Ultrastruktur des Hufhorns?

### Versuchsansatz:

Material eines gesunden Pferdehufs (Bereiche Hufseitenwand und Wandbereich Sohle) wurde vom Hufschmied im Rahmen der normalen Hufbearbeitung abgenommen und in unserem Labor (Institut für Morphologie/AG Histologie) weiterbearbeitet. Die Proben (Wand, Wandbereich Sohle) wurden entweder mit *Primer Carré mix Spray* oder *3M Universalprimer* vorbehandelt und dann jeweils das Klebepad *3M HVB* aufgebracht und für 6 Wochen bei Raumtemperatur am Hufmaterial belassen. Proben vom jeweils unmittelbar benachbarten Hufbereich wurden als unbehandelte Kontrollen unter denselben Bedingungen gelagert. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Proben mittels Diamantbandsäge (Primus 2) in für die mikroskopische Untersuchung geeignete Stücke zerteilt, diese in 3 % Glutaraldehyd fixiert (72 h), mit Osmiumtetroxid nachfixiert (17 h), entwässert und in Epon-Kunstharz eingebettet. Das Klebepad *3M HVB* mitsamt der Folie wurde dabei während des gesamten Prozesses am Hufmaterial belassen.

Von den in Epon Kunstharz eingebetteten Huftteilen erfolgte die Anfertigung von Semidünn-Schnitten (Schnittdicke 1µm) an einem Reichert Ultracut S Ultramikrotom mittels Diamantmesser und eine Anfärbung der Schnitte durch Toluidinblau zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Hufstruktur. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem, mit Kamera ausgestatteten, Lichtmikroskop (Olympus BX53, Software cellSens). Im Rahmen dieser Auswertung wurden geeignete Stellen für die weitere Bearbeitung zur ultrastrukturellen Beurteilung ausgewählt. Von diesen Bereichen wurden Ultradünn-Schnitte (Schnittdicke 70 nm) mittels Diamantmesser hergestellt, auf mit Formvar beschichtete Kupfernetzchen aufgebracht und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Auswertung dieser Schnitte erfolgte im Zeiss EM900 Transmissions-Elektronenmikroskop. Entsprechende Kontrollen- unbehandelte Huftteilen von Wand und Wandbereich Sohle- wurden jeweils mitgeführt.

### Ergebnisse:

Nach der Einwirkdauer von 6 Wochen wurden makroskopische Aufnahmen von den Hufbereichen angefertigt. Es konnten keine morphologischen Veränderungen (Farbe, Konsistenz) der Hornstruktur an den mit Primer (*Carré mix Primer* oder *3M Universalprimer*) und Klebepad *3M HVB* behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet werden (**Abbildung 1**).

Die mit Toluidinblau gefärbten Epon-Semidünnschnitte zeigten im Mikroskop sehr gut die Hornstruktur mit Hornröhrchen und den verhornten Keratinozyten (Hornzellen). Die ursprünglichen Grenzen der Keratinozyten waren noch deutlich zu erkennen. Auch die Klebepads sind erhalten und sichtbar und die Verbindung des Klebepads mit der Hornsubstanz ist auch nach der

Einbettungsprozedur größtenteils noch vorhanden. Die Klebepads sind - als nicht-biologisches Material - nicht gut vom Epon-Harz durchdrungen worden, daher war dieser Bereich zum Teil sehr schlecht schneidbar (löchriges Aussehen dieses Materials). Am Schnitt sichtbare unterschiedliche Anfärbungen (hell/dunkel) in der Tiefe des Hufpräparats sind auf die geringe Durchdringung mit Osmiumtetroxid zurückzuführen und kein Anzeichen einer strukturellen Veränderung. Die lichtmikroskopische Auswertung der Proben vorbehandelt mit *Carré mix Spray* oder *3M Universalprimer* und Klebepads *3M HVB* zeigte keine erkennbare Veränderung der Hornstruktur im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 2**).

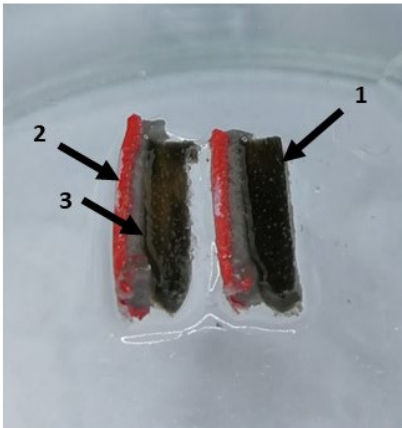
Die transmissions-elektronenmikroskopische Auswertung zeigte ebenfalls die Keratinozyten mit ihren ursprünglichen Zellgrenzen, auch die Keratinfilamente sind teilweise noch zu erkennen. Die Ansnittrichtung der Keratinozyten ist zwischen den Präparaten geringgradig unterschiedlich, was sich in der Form der verhornten Zellen und der Anordnung der Keratinfilamente (längs, quer, schräg) zeigt. Im Vergleich konnten keine Unterschiede in der Morphologie der Keratinozyten des mit *Carré mix Spray* oder *3M Universalprimers* und mit Klebepads *3M HVB* versehenen Hufmaterials mit dem unbehandelten Kontroll-Huf festgestellt werden (**Abbildung 3**).

#### **Zusammenfassung:**

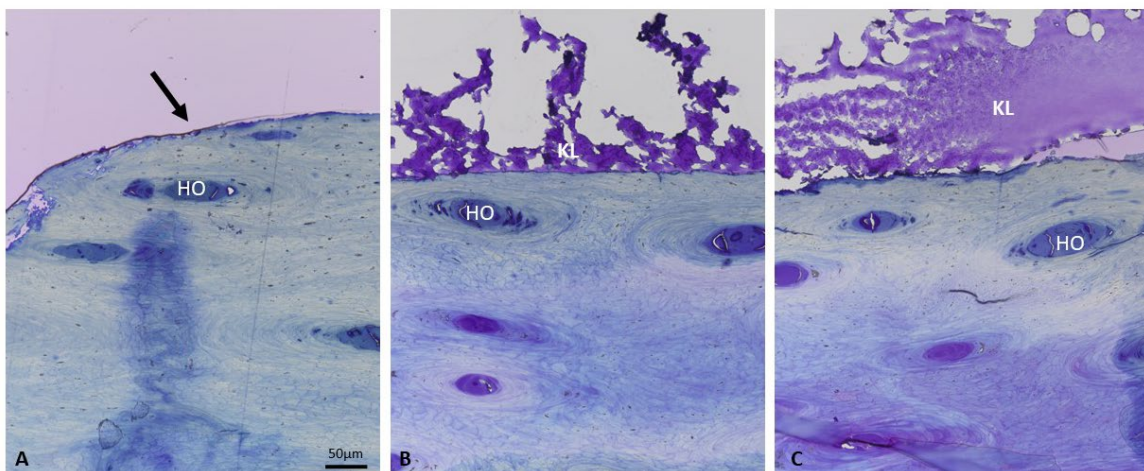
Im getesteten Zeitraum konnten keine makroskopisch erkennbaren morphologischen Veränderungen der Hornstruktur in den untersuchten Bereichen der Hufwand beobachtet werden. Auch mittels lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen zeigten sich bei beiden getesteten Systemen im untersuchten Zeitraum keine strukturellen Veränderungen der Hornstruktur des Hufes im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

a. Univ. Prof. Dr. Ingrid Walter

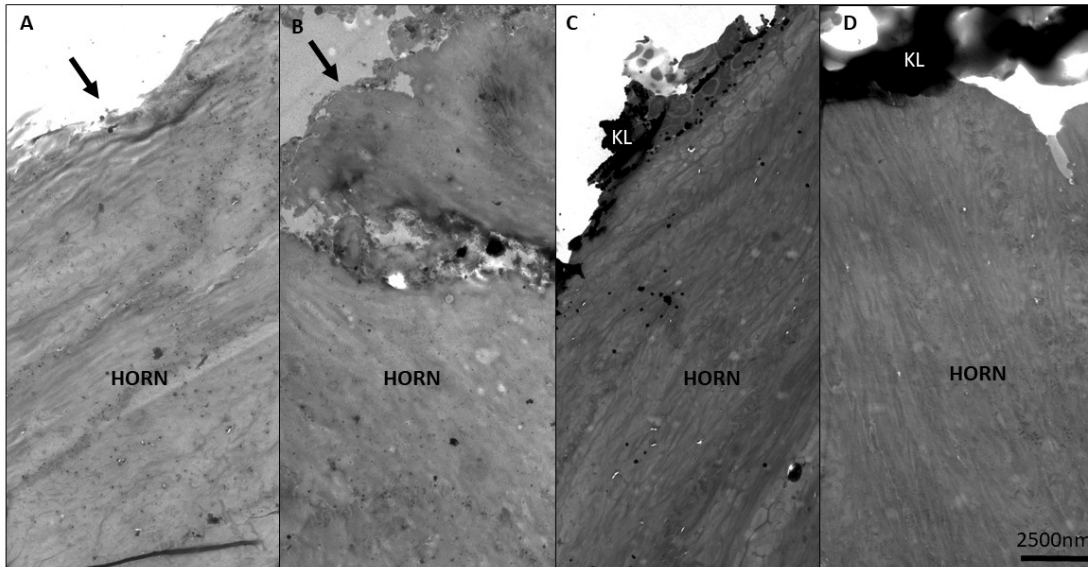
**Abbildungen:**



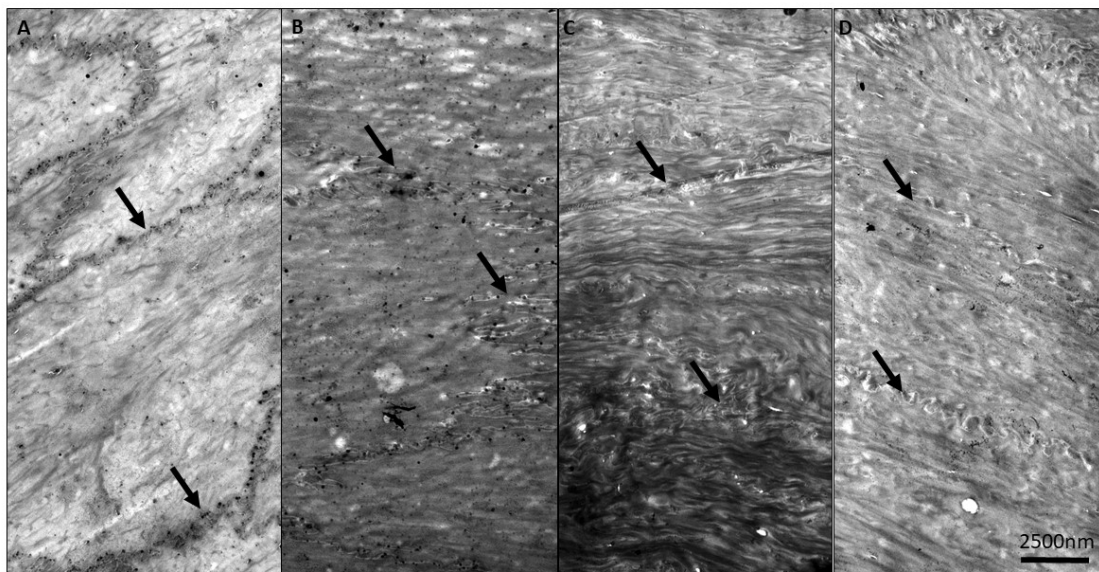
**Abbildung 1: Makroskopische Aufnahme** von den Proben Hufwand (1) nach der Bearbeitung mit der Diamantbandsäge. Das Klebepad 3M HVB (2) mit der Folie (3) ist an der Hufstruktur gut sichtbar.



**Abbildung 2: Semidünnschnitte Hufwand, Toluidinblaufärbung.** A) Schnitt aus der Hufseitenwand, unbehandelt. B) Schnitt aus der Hufseitenwand mit *Primer Carré* und 3M HVB behandelt. C) Schnitt aus der Hufseitenwand mit 3M *Universalprimer* und 3M HVB behandelt. HO=Hornröhrchen, Pfeil=markiert die Außenseite, KL=Klebepadreste.



**Abbildung 3a: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen** von Ultradünnschnitten. A) und B) Kontrolle; Huf unbehandelt. C) Hufseitenwand mit *Primer Carré* und *3M HVB* behandelt. D) Hufseitenwand mit *3M Universalprimer* und *3M HVB* behandelt. Man sieht die Verlaufsrichtung der Keratinfilamente. Es sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar. Pfeil=markiert die Außenseite. KL=Klebeadreste.



**Abbildung 3b: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen** von Ultradünnschnitten aus dem Bereich unter der Oberfläche. A) und B) Kontrolle; Huf unbehandelt. C) Hufseitenwand mit *Primer Carré* und *3M HVB* behandelt. D) Hufseitenwand mit *3M Universalprimer* und *3M HVB* behandelt. Die Zellgrenzen der ursprünglichen Keratinozyten sind noch zu erkennen. Es sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar. Pfeile=markieren die ursprünglichen, wellig verlaufenden Keratinozytengrenzen.