

---

## **E Diskussion**

In der Vergangenheit wurde in klinischen Studien gezeigt, dass das wasserlösliche Vitamin Biotin (in pharmakologischen Dosen) einen Einfluss auf die Gesundheit der Klaue bei Rindern hat (HIGUCHI et al., 2004; BERGSTEN et al., 2003; LISCHER et al., 2002; HEDGES et al., 2001; EGGERS, 2001; FRITZGERALD et al., 2000; HOCHSTETTER, 1998; MIDLA et al., 1998).

Viele verschiedene äußere Faktoren, z.B. die Haltungsform, Bodenbeschaffenheit, Fütterung, das Alter der Tiere und die Jahreszeiten, um nur einige zu nennen, haben Einfluss auf die Klauengesundheit (TOMLINSON et al., 2004; FITZGERALD et al., 2000; MÜLLING et al., 1999; HOCHSTETTER, 1998). Bei der Erforschung der Wirkung von Biotin auf die Klauengesundheit stellt die Erfassung der Hornqualität eine besondere Herausforderung dar. Die Hornqualität ist von unterschiedlichsten Parametern abhängig, exemplarisch seien hier Hornhärte, Wassergehalt und Zugfestigkeit genannt (TOMLINSON et al., 2004, BUDRAS u. PATAN, 2003; PATAN u. BUDRAS, 2003; MÜLLING et al., 1999; SCHMID, 1995; DISTEL u. SCHMID, 1994). Die einzelnen Parameter wiederum werden von Faktoren beeinflusst, die in drei Faktorengruppen (Architektur des Hornzellverbandes, intrazelluläre und interzelluläre Faktoren) eingeteilt werden können (MÜLLING et al., 1994; MÜLLING, 1993; PELLMANN et al., 1993). Dieser multifaktorielle Zusammenhang erklärt, warum der Einfluss von Biotin auf die Gesundheit der Klauen bisher noch nicht exakt zugeordnet werden konnte. Ebenso ist noch kein objektiver Beweis für den genauen Wirkmechanismus von Biotin auf das Horn geführt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem klinischen Status der Klauen, histologische Befunde und die Fettsäurezusammensetzung des Ballenhorns der Rinderklaue unter Einfluss von Biotin untersucht. Die morphologischen Befunde wurden mit Hilfe von Bewertungsschlüsseln ausgewertet und mit den klinischen, sowie biochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verknüpft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden im Anschluss an eine kritische Betrachtung der Methodik diskutiert.

## **1 Diskussion der Methodik**

### **1.1 Versuchsaufbau**

Im Rahmen eines Feldversuches ist es nicht immer möglich, standardisierte Bedingungen zu schaffen. Des Weiteren sind, wie auch in dieser Arbeit, kleine Versuchsgruppen unvermeidbar. Durch unvorhersehbare Ereignisse (z.B. Krankheit und Schlachtung) kann sich die Versuchsgruppengröße während des Untersuchungszeitraums noch verringern. Das wiederum kann zur Folge haben, dass die Ergebnisse keine Allgemeingültigkeit besitzen und keine statistisch abgesicherte Aussagen erlauben. Der Vorteil eines Feldversuches liegt in dem umfassenden Gesamtbild und in der Umsetzbarkeit der Ergebnisse in die landwirtschaftliche Praxis. Ebenfalls nicht vernachlässigt werden sollte der große Vorteil für die Tiere. Die Kühe können im Rahmen eines Feldversuches in ihrem gewohnten Umfeld, relativ stress- und schmerzfrei untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden herangezogen und kombiniert, um die Wirkung von Biotin auf die Klauengesundheit in der landwirtschaftlichen Praxis zu untersuchen.

Zur Probenentnahme wurde das Ballensegment gewählt, da an dieser Stelle, schmerzfrei für die Tiere, ausreichende Mengen an Hornmaterial gewonnen werden konnten. Die definierte Lokalisation (Probenentnahmestelle siehe Textabb.1, S. 33) ermöglichte es, immer an der gleichen Stelle an den Klauen Hornproben zu gewinnen und somit eine gute Vergleichbarkeit nicht nur innerhalb der Versuchsgruppe, sondern auch mit verschiedenen Terminen zu erhalten. Die Probenentnahme während der Klauenpflege stellte sich als sehr praktikabel dar. Besonders für die Tiere war es kein außergewöhnlicher Stress, da sie die Prozedur der Klauenpflege kannten.

Die Biotinzufütterung an die Kühe erfolgte über eine computergestützte Transponderfütterung in Futterstationen. Es kam während des Versuchszeitraums zu Problemen mit dem Computer und die Einteilung der Versuchsgruppen wurde kurzzeitig nicht für alle Kühe eingehalten. Es wurden nur die Tiere ausgewertet, die eindeutig ihrer Gruppe zugeordnet werden konnten. Die zu Beginn der

---

Untersuchung höhere Tierzahl der Versuchsgruppen (43 Kühe der Biotin- und 33 Kühe der Kontrollgruppe) wurde dadurch reduziert. Anhand der Milchbiotinwerte konnte die Einteilung der Kerngruppe (12 Biotin- und 12 Kontrollkühe) bestätigt werden. Die Zufütterung des Biotin-Sojagemisches über eine computergestützte Transponderfütterung stellte sich als sehr geeignet dar. Diese Methode der Biotinsupplementierung wurde in weiteren Untersuchungen ebenfalls erfolgreich eingesetzt (HIGUCHI et al., 2004; BERGSTEN et al., 2003; HEDGES et al., 2001; FITZGERALD et al., 2000). Die computergestützte Fütterungstechnik ist jedoch mit hohen Kosten verbunden und in kleineren Betrieben nur mit erhöhtem Aufwand umsetzbar. Um in solchen Betrieben die Biotinapplikation zu gewähren, schlug schon HUNKELER (1996) vor, Biotin mit dem Kraftfutter in Pelletform zu verabreichen, damit es nicht zu einer Entmischung aus dem Kraftfuttermisch kommen kann.

Die Biotinmenge in der Milch und den Futtermitteln wurde bestimmt, um die Konzentration in der Verabreichung des Vitamins zu überprüfen. Die Bestimmung der Milchbiotinwerte ist eine bewährte, nichtinvasive Methode zur Kontrolle der Biotinsupplementation. Die in dieser Arbeit analysierten Milchbiotinwerte lagen im Mittel bei den nicht supplementierten Kühen zwischen 11,0 und 22,54 µg/l. Dies entspricht den Literaturangaben für Kuhmilch von 13,0 bis 34,9 µg/l. Bei einer täglichen Biotingabe von 20 mg/Tier, steigt der Milchbiotinwert laut Literatur im Mittel auf 80 bis 138,7 µg/l an (HOCHSTETTER, 1998; KLÜNTER u. STEINBERG, 1993; BONJOUR, 1991). In dieser Arbeit stiegen die Milchbiotinwerte innerhalb der Biotingruppe im Mittel auf 89,14 bis 98,9 µg/l an. Da die Biotinwerte in den Grundfuttermitteln nur den geringen, natürlichen Schwankungen unterlagen, sind die erhöhten Milchbiotinwerte in der Biotingruppe als Bestätigung der tatsächlich erfolgten Biotinsupplementation zu werten.

## **1.2 Untersuchungsmethoden**

Um eine makroskopisch sichtbare Veränderung in der Klauengesundheit festzustellen, wurde die Hornkapsel auf pathologische Veränderungen hin untersucht. Die klinischen Diagnosen wurden von zwei Tierärzten erhoben und in

## Diskussion

---

Protokollen, sowie mit einer Digitalkamera dokumentiert. Diese Form der Dokumentation wurde in vorherigen Untersuchungen schon erfolgreich eingesetzt (EGGERS, 2001; HOCHSTETTER, 1998; KOLLER, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Dokumentation mit Protokollen und Fotoapparat bei der späteren Auswertung sehr hilfreich ist. Da die Untersuchungszeit der Klauen während der Klauenpflegetermine auf ein bis zwei Minuten befristet war, kam es vor, dass einzelne Veränderungen nicht eindeutig protokolliert wurden. Auf den Fotos wurden diese Veränderungen später gesichtet und konnten somit noch in die Auswertung eingehen.

In vorherigen Forschungsarbeiten wurde bei der histologischen Untersuchung von Hornmaterial der Schwerpunkt auf die Struktur des Klauenhorns und die histochemische Reaktion der Hornzellen gelegt (ANTHAUER et al., 2005; HIGUCHI et al., 2004; PATAN u. BUDRAS, 2003; EGGERS, 2001; FROHNES u. BUDRAS, 2001; MÜLLING et al., 1999; KOLLER, 1998; BUDRAS et al., 1997; SCHMID, 1995; ZENKER, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde in der Histologie, neben der morphologischen Beurteilung, die Objektivierbarkeit von histologischen Ergebnissen herausgearbeitet. Für die Beurteilung lichtmikroskopischer Schnitte wurden in der Vergangenheit Histologienotensysteme entwickelt (EGGERS, 2001; KOLLER, 1998). Dabei wurde jedoch immer das Gesamtbild der histologischen Schnitte beurteilt, d.h. es wurden immer mehrere Kriterien gleichzeitig herangezogen, um eine „Gesamtnote“ zu vergeben. Diese verfeinerte Form der klassischen Bildbeschreibung in der Histologie wurde in dieser Arbeit zusätzlich objektiviert und erstmalig auch bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung angewendet. Zur Objektivierung der Untersuchung der histologischen Hornstrukturen wurden Bewertungsschlüssel (siehe Kap. C Material und Methoden, unter 2.2, Textabb. 2, S.38; Textabb. 3, S. 40 und Textabb. 4a und 4b, S. 42/43) entwickelt. Damit konnten die histologischen Schnitte, in Ergänzung und Präzisierung zur klassischen Bildbeschreibung beurteilt und ausgewertet werden. Hierfür wurden gezielt Kriterien ausgewählt, die es ermöglichen, intra- und interzelluläre Faktoren des Ballenhorns zu beurteilen. Diese Kriterien wurden in drei möglichen Erscheinungsformen klar definiert und entsprechend den Zahlen „1“ für

---

wünschenswerter Zustand, „2“ für mäßiger Zustand und „3“ für unerwünschter Zustand zugeordnet. Die Untersuchung der Ultrastruktur der Hornzellen erfolgte jeweils in zwei getrennten Durchgängen. Um die Anwendbarkeit der Bewertungsschlüssel am Transmissionselektronenmikroskop zu überprüfen, wurde diese Untersuchung von einer zweiten Person, ebenfalls in zwei unabhängigen Durchgängen, wiederholt. Die Bewertungen beider Untersucher wurden miteinander verglichen. Es gab nur leichte Abweichungen in der Bewertung, und über 70% der Bewertungen stimmten völlig überein. Dies ist als ein Beweis für die Anwendbarkeit der Bewertungsschlüssel zu werten. Da die Bewertungsschlüssel es ermöglichen, die jeweiligen Kriterien und somit das histologische Bild in Zahlen auszudrücken, sind die Ergebnisse objektiver und statistisch besser auswertbar. Damit wurde eine bessere Vergleichbarkeit der histologischen Auswertungen innerhalb dieser Untersuchung erreicht.

Die Voraussetzungen für das Erstellen der Bewertungsschlüssel sind unter anderem gute Kenntnisse im ultrastrukturellen Aufbau des Hornmaterials. Ebenso wichtig ist die Gegenkontrolle durch mindestens einen zweiten, unabhängigen und qualifizierten Untersucher, der ebenfalls in mindestens zwei Durchgängen die Schnitte beurteilt. Des Weiteren sind Voruntersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop nötig, um die zu untersuchenden Strukturen in klar definierten Kriterien festzulegen. Damit in weiteren Untersuchungen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse, auch innerhalb verschiedener Arbeiten mit solchen Bewertungsschlüsseln erreicht werden kann, bedarf es einer kritischen Überarbeitung der einzelnen Kriterien. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die einzelnen Kriterien nicht ohne weiteres als allgemeingültig angesehen werden können. Es ist für jede weitere Untersuchung nötig, die Bewertungsschlüssel entsprechend zu überarbeiten und anzupassen.

Bei einer kritischen Betrachtung dieser Methode können methodisch bedingte Fehler, wie sie in der Histologie bekannt sind, nicht ausgeschlossen werden. Trotz größtmöglicher Sorgfalt bei der Herstellung der Schnitte, kann z.B. keine Garantie für eine immer gleiche Schnittdicke gegeben werden. Dies wäre jedoch bei semiquantitativen Nachweismethoden, wie z. B. der PAS-Reaktion wünschenswert. Des Weiteren können auch bei dieser Methode Artefakte zu

## Diskussion

---

fehlerhaften Interpretationen führen. Fixierungs- und einbettungsbedingte Artefakte wurden in dieser Arbeit durch die Verwendung von „Nativschnitten“ ausgeschlossen. Die Methode zur Herstellung von „Nativschnitten“ nach BUDRAS et al. (2002) stellt eine für das tote und relativ harte Hornmaterial sehr geeignete und zeitsparende Methode dar, weil auf die gesamte Fixierungs- sowie Einbettungsprozedur verzichtet und so die damit verbundene Artefaktgefahr ausgeschlossen werden konnte.

Neben den klinischen und morphologischen Untersuchungen ist der Einfluss von Biotin auf die Fettsäurezusammensetzung im Klauenhorn von großem Interesse. Dieser Einfluss ist in der Literatur, im Zusammenhang mit der Rinderklaue, bisher wenig beachtet worden. Im Department of Agriculture and Forestry, University of Aberdeen, Scotland, wurden mehrere Vorversuche zur Extraktion der Lipide aus dem Hornmaterial durchgeführt (MEYER, 2004). Dabei wurden zwischen der klassischen und der Refluxmethode keine Unterschiede in den Ergebnissen festgestellt. Die Refluxmethode stellte sich als Zeit und Material sparende Methode heraus.

## **2 Diskussion der Ergebnisse**

Die folgende Diskussion der Ergebnisse wird in drei Unterkapitel gegliedert. Dies ist erforderlich, da die morphologischen und histologischen Ergebnisse auf Hornproben aus der rechten Hintergliedmaße basieren, während für die Fettsäureanalyse mehr Hornmaterial benötigt wurde und somit Hornproben von allen vier Klauenpaaren pro Tier verwendet wurden. Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse müssen somit einzeln betrachtet werden und können nur bedingt im Zusammenhang mit den restlichen Ergebnissen bewertet werden. Des Weiteren werden die morphologischen Ergebnisse einzeln betrachtet, da eine Vergleichbarkeit zu vorherigen Arbeiten angestrebt wird.

### **2.1 Klinische Ergebnisse**

An den Klauen der Biotintiere (12 Kühe) wurden vor der Biotinsupplementation mehr krankhafte Veränderungen ermittelt als bei den Kontrolltieren (12 Kühe). Besonders häufig wurden dabei Klauengeschwüre diagnostiziert, gefolgt von

---

Blutungen. In der Kontrollgruppe wurde bei den meisten Tieren kein besonderer Befund erhoben, bei einem geringen Anteil in dieser Gruppe wurde, an den Hinterklauen, ausschließlich der Befund Blutung diagnostiziert.

Nach 13 Monaten Biotinsupplementation wurde in der Biotingruppe eine Verbesserung der Klauengesundheit festgestellt, während in der Kontrollgruppe eine Verschlechterung zu beobachten war. Das kann im Wesentlichen als Bestätigung der Ergebnisse in vorangegangenen Langzeituntersuchungen gewertet werden (HEDGES et al., 2001; FITZGERALD et al., 2000; HOCHSTETTER, 1998; BUFFA, 1992; LEU, 1987; BRYANT et al., 1985; WEBB et al., 1984).

Am deutlichsten ist in der Biotingruppe der Anteil an Klauengeschwüren zurückgegangen. Von den sechs Kühen mit einem Klauengeschwür vor der Biotinsupplementierung waren drei Kühe nach 13 Monaten Biotingabe ohne besonderen Befund, und drei Kühe hatten an beiden Terminen ein Klauengeschwür. In der Kontrollgruppe gab es zu Versuchsbeginn kein Tier mit einem Klauengeschwür, am letzten Termin waren zwei Tiere an einem Klauengeschwür erkrankt. In vorherigen Arbeiten wurde festgestellt, dass Klauengeschwüre innerhalb von 50 Tagen, unabhängig von einer Biotingabe, verheilen (LISCHER et al., 2002). Es wurden dabei keine makroskopisch sichtbaren Unterschiede zwischen den Biotin- und Kontrolltieren gefunden. In den tieferen Gewebeschichten konnten jedoch histologisch Veränderungen, wie z.B. mehr Mikrorisse, bei den Kontrolltieren nachgewiesen werden (EGGERS, 2001; KOLLER, 1998). Da in der vorliegenden Untersuchung die Biotingabe wesentlich länger erfolgte als 50 Tage, können die Klauengeschwüre in der Biotingruppe zum letzten Probenentnahmeterrnin als neu entstanden oder auch als Rezidive interpretiert werden. Die Vermutung einer genetischen Disposition der Hornqualität und somit der Klauengesundheit kann hier nicht ganz ausgeschlossen werden, insbesondere da das Alter der Kühe mit Klauengeschwüren in beiden Gruppen vergleichbar zwischen drei und vier Jahren lag. Lediglich eine Kontrollkuh, Hilde (Stallnummer 109), war fünf Jahre alt.

Da die Hälfte der Biotinkühe nach 13 Monaten Biotinsupplementation keine Klauengeschwüre mehr aufwiesen, kann dies als deutliches Indiz einer

## Diskussion

---

Biotinwirkung gewertet werden. Dabei scheint Biotin nicht direkt auf die Wundheilung zu wirken, sondern die Applikation dürfte vielmehr eine prophylaktische Unterstützung in der Hornqualität und somit Klauengesundheit ausüben. Biotin könnte im Bereich der drei Faktorengruppen (Architektur des Hornzellverbandes, intrazelluläre und interzelluläre Faktoren) die Hornqualität beeinflussen und somit längerfristig zu gesünderen Klauen führen. So wäre denkbar, dass Biotin als prosthetische Gruppe des Enzyms Acetyl-CoA-Carboxylase Einfluss auf den entscheidenden Schritt in der Fettsäuresynthese nimmt (WEISS u. ZIMMERLY, 2000; STRYER, 1999; LÖFFLER u. PETRIDES, 1998; MOCK, 1996; COOPER, 1993). Dadurch könnte Biotin die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Kitsubstanz mitbeeinflussen und somit zu einem besseren Zusammenhalt der Hornzellen führen (die Ergebnisse der Lipidanalyse werden unter 2.3, ab Seite 110 eingehender diskutiert). Diese Hypothese wird durch die zum letzten Termin in dieser Untersuchung aufgetretene Diagnose Morbus Mortellaro (Dermatitis digitalis) unterstützt. So gab es am ersten Probenentnahmeterrin im Betrieb keine Probleme mit dieser infektiösen Erkrankung des Zwischenklauenspaltes. Weder in der Biotin- noch in der Kontrollgruppe wurde diese Diagnose erhoben. Nach 13 Monaten aber war die Erkrankung im gesamten Betrieb stark verbreitet. In der Kontrollgruppe wurde die Diagnose Morbus Mortellaro (Dermatitis digitalis) bei der Hälfte der Tiere festgestellt, während in der Biotingruppe nur zwei (von 12) Tiere betroffen waren. Dies bestätigt die Ergebnisse von vorangegangenen Arbeiten, in denen ein deutlicher Rückgang von Entzündungen im Zwischenklauenspalt nach 12 Monaten Biotingabe beobachtet wurde (HOCHSTETTER, 1998; DISTL u. SCHMID, 1994). Natürlich kann Biotin keine Infektionskrankheiten verhindern, aber auch in diesem Zusammenhang könnte ein guter Zellzusammenhalt das Infektionsrisiko zumindest vermindern.

---

Die Ätiologie von Blutungen an den Klauen ist sehr vielfältig. Dabei stehen traumatische Einflüsse auf die Klaue im Vordergrund. So wurde in der Vergangenheit eine Zunahme der Klauenhornhärte und somit ein besserer Schutz der Klaue vor Traumatisierung unter Biotin festgestellt (SCHMID, 1995; DISTL u. SCHMID, 1994). Diese Feststellung kann mit dieser Arbeit für das Ballenhorn nicht bestätigt werden. Die Diagnose Blutung ging bei dieser Untersuchung in beiden Gruppen gleichermaßen zurück. Dies entspricht den Ergebnissen von HOCHSTETTER (1998). Es kann kein deutlicher Unterschied zwischen Biotin- und Kontrollkühen nachgewiesen werden.

Die klinischen Ergebnisse deuten insgesamt auf eine positive Wirkung von Biotin auf den Gesundheitszustand der Klaue hin. Die äußeren Umwelteinflüsse waren - bedingt durch die gemeinsame Laufstallhaltung aller Kühe - zwar weitestgehend vergleichbar, jedoch konnten die individuellen und genetischen Faktoren in dieser Untersuchung nicht ausreichend berücksichtigt werden. Zudem ist die Versuchsgruppe zu klein, um statistisch abgesichert eine Biotinwirkung zu beweisen.

## **2.2 Histologische Ergebnisse**

In der Lichtmikroskopie wurde mit dem semiquantitativen Nachweis der PAS-Reaktion kein Hinweis auf eine biotinabhängige Veränderung festgestellt. Diese lichtmikroskopische Methode scheint nicht empfindlich genug zu sein, um Veränderungen deutlich darzustellen. Wie schon HOCHSTETTER (1998) bei ihren Untersuchungen an der Rinderklaue feststellte, ist dieses Ergebnis nicht außergewöhnlich. Es war nicht zu erwarten, dass die unter Biotinmangel bereits makroskopisch deutlich sichtbaren Befunde (MÜLLING et al., 1999; WÄSE, 1999; BITSCH u. BARTEL 1994; KOPINSKI u. LEIBHOLZ, 1989; WHITEHEAD, 1988; GEYER et al., 1984 und 1981; FRIGG u. TORHORST, 1980) unter Biotinsupplementierung einfach umkehrbar seien. Die Hornqualität und die Klauengesundheit müssen in einem multifaktoriellen Zusammenhang betrachtet werden, in dem Biotin an verschiedenen Strukturen ansetzen kann. Des Weiteren hat die Dicke der histologischen Schnitte einen Einfluss auf die Ergebnisse. Besonders bei histochemischen Untersuchungen kann es zu unklaren,

## Diskussion

beziehungsweise fehlerhaften Reaktionen und somit zu Fehlinterpretationen kommen.

Bei den ebenfalls lichtmikroskopisch ausgewerteten Semidünnschnitten konnte an der intrazellulären Homogenität keine deutliche Veränderungen unter Biotinsupplementation festgestellt werden. Es wurden jedoch bei sieben Biotinkühen (KuhNr.: 99, 112, 117, 118, 120, 124, 125) schon an den Semidünnschnitten Hinweise auf die Keratinfilamente gesehen, die an den Ultradünnschnitten im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bestätigt werden konnten. Ebenso wurde bei vier Kontrollkühen (KuhNr.: 20, 54, 95, 129) die intrazelluläre Homogenität an den Semidünnschnitten entsprechend der ultrastrukturellen Anordnung der Keratinfilamente beurteilt. Die interzellulären Zusammenhangstrennungen ergaben ebenfalls keinen eindeutigen Beweis für den Einfluss von Biotin auf die Klauengesundheit. Es wurde auch bei diesem Kriterium gut die Hälfte der Schnitte lichtmikroskopisch schon entsprechend der ultrastrukturellen Untersuchung am TEM (Transmissionselektronenmikroskop) beurteilt (vier Biotintiere, KuhNr.: 99, 100, 106, 124 und fünf Kontrolltiere, KuhNr.: 20, 86, 102, 109, 129). Somit konnte gezeigt werden, dass die lichtmikroskopische Voruntersuchung an den Semidünnschnitten für die ultrastrukturelle Untersuchung unentbehrlich ist.

Die deutlichsten Hinweise auf eine ultrastrukturell wahrnehmbare Biotinwirkung ergaben die Beurteilungen der interzellulären Kittsubstanz und der intrazellulären Lipidtropfen am TEM. So wurde in der Biotingruppe bei fünf Tieren (KuhNr.: 89, 112, 120, 124, 126) eine feinkörnigere Kittsubstanz (Membrane Coating Material) gesehen und weniger intrazelluläre Lipidtropfen gesichtet. Unter den Kontrollkühen konnte dieser Zusammenhang nur bei drei Tieren (KuhNr.: 54, 81, 129) festgestellt werden. Die Erweiterungen im Interzellularspalt waren nach der Biotinsupplementierung bei den Biotinkühen deutlicher mit Kittsubstanz gefüllt.

Die Funktion der intrazellulären Lipide ist nach wie vor nicht geklärt. So könnten die Lipide, wie schon HOCHSTETTER (1998) vermutete, den Hornzellen und somit dem Ballenhorn eine zusätzliche Elastizität verleihen. Nach BUDRAS et al., (1996) stellen intrazelluläre Lipidtropfen eine Energiereserve der Hornzellen dar.

---

Denkbar wäre, dass Biotin über den Energiebedarf der Zelle während der Verhornung Einfluss auf die spätere Hornqualität nimmt. Beim Abbau ungeradzahliger Fettsäuren entsteht unter anderem Propionyl-CoA. Das biotinabhängige Enzym Propionyl-Carboxylase carboxyliert Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA, das wiederum als Succinyl-CoA Anschluss an den Citratzyklus erhält und somit zur Energiegewinnung beiträgt (STRYER, 1999; LÖFFLER u. PETRIDES, 1998; COOPER, 1993). Im Umkehrschluss könnte es bei Biotinmangel bedeuten, dass diese Lipid-Energiereserve nicht genutzt werden kann, da dem Enzym Propionyl-Carboxylase die prosthetische Gruppe, das Biotin, fehlt. Somit würden im Stratum corneum vermehrt intrazellulär Lipidtropfen sichtbar sein. Dies könnte im proximalen Ballensegment als Kriterium für schlechte Hornqualität gewertet werden, da nach MÜLLING (1993) im Stratum corneum intrazelluläre Lipidtropfen, ebenso wie intrazellulär eingeschlossenes Glykogen und Kernreste, ein Kriterium für eine unvollständige Verhornung bei hoher Proliferationsrate darstellen.

Die Zusammensetzung des Membrane Coating Material (MCM) ist bisher vor allem an der Haut von Menschen und Schweinen untersucht worden. Dabei wurde in verschiedenen Untersuchungen beobachtet, dass die Lipidzusammensetzung sich im Verlauf der epidermalen Differenzierung verändert. Es wurden insbesondere Ceramide neben Cholesterin und freien Fettsäuren im Stratum corneum, sowie Variationen in der Verteilung der Lipide je nach Region beschrieben (WEERHEIM u. PONEC, 2001; WERTZ, 2000 und 1997; ELIAS 1983; LAMPE et al., 1983; SCHNEIDER et al., 1983). So fanden WEERHEIM u. PONEC (2001) im Stratum corneum der menschlichen Haut 16-70% Ceramide, 12-52% Cholesterin und 12-64% freie Fettsäuren und erklärten sich diese starken Schwankungen mit der Lage, bzw. Region der Haut, den Haut-Typen, dem Alter und weiteren Einflussmöglichkeiten. Ebenso konnte eine segmentspezifische Verteilung der Membrane Coating Granules (MCGs) am Hufhorn (ANTHAUER et al., 2005), bzw. der Glykoproteine und der komplexen Lipide am Klauenhorn (MÜLLING u. BUDRAS, 1998) nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass die Zusammensetzung des MCMs der jeweiligen Belastung der Haut, bzw. des Horns angepasst ist.

## Diskussion

---

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden am Ballenhorn des Rindes durchgeführt. Da die Ceramide nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, ist eine Vergleichsmöglichkeit, insbesondere zwischen den Segmenten, nicht gegeben. Durch die oben angeführten Untersuchungen und die eigenen morphologischen Beobachtungen, insbesondere an der Kittsubstanz (Membrane Coating Material), wird die Hypothese, dass Biotin Einfluss auf die Klauengesundheit haben kann, untermauert. Denkbar wäre, dass durch eine bessere, intrazelluläre Energiebereitstellung (durch den Abbau von ungeradzahligen Fettsäuren, über das Enzym Propionyl-Carboxylase) die Synthese der MCGs und des MCMs verstärkt wird. Des Weiteren könnte die Zusammensetzung des MCMs über das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase und somit über die Fettsäuresynthese beeinflusst werden. Wird das MCM also vermehrt und mit einem höheren Anteil an langkettigen Fettsäuren in den Interzellularspalt abgegeben, könnte es am Ballenhorn zu einem verstärkten Zellzusammenhalt kommen. Dadurch würde das Stratum corneum dem natürlichen Abrieb länger standhalten, und z.B. aufsteigende Infektionen zurückgehalten werden. Dies wiederum bedeutet gesündere Klauen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als weitere Indizien für eine positive Wirkung von Biotin auf die Klauengesundheit gewertet werden. Dabei darf nicht außer acht gelassen werden, dass im Rahmen dieses Feldversuches nur eine kleine Versuchsgruppe zur Verfügung stand.

### **2.3 Ergebnisse der Lipidanalyse**

Die Menge der Hornproben vom ersten Probenentnahmeterrin war nicht ausreichend für eine Lipidanalyse. Am letzten Probenentnahmeterrin wurde entsprechend mehr Hornmaterial gewonnen und konnte analysiert werden. Da es für das Ballenhorn der Klaue bisher keine eingehende Untersuchung zur Fettsäurezusammensetzung gab, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Gegenüberstellung der Fettsäurezusammensetzung des Ballenhorns von biotinsupplementierten und nicht-biotinsupplementierten Kühen. Die analysierten Fettsäuren wurden dabei nach Kettenlänge in Gruppen zusammengefasst betrachtet.

---

Die Extraktion der einfachen (Lipid 1) und der komplexen (Lipid 2) Lipide aus dem Hornmaterial und die anschließende Analyse der Fettsäuren ergaben geringe bis deutliche Unterschiede zwischen den Biotin- und Kontrollkühen. In beiden Lipidgruppen (Lipid 1 und Lipid 2) wurden innerhalb der hydroxylierten-Fettsäure-Methylester (OH-FAME) vergleichbare Peaks der Fettsäuren gefunden. Dabei wurden nur geringe Schwankungen zwischen den Biotin- und den Kontrolltieren beobachtet. Diese Schwankungen lassen sich am ehesten mit individuellen Unterschieden erklären. Innerhalb der nicht-hydroxylierten-Fettsäure-Methylester (non-OH-FAME) wurden bei beiden Lipidgruppen die deutlichsten Peaks im Bereich der Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C16 und C18 gefunden. Dies entspricht den Ergebnissen von MEYER et al., (2002). Sie fanden im Rinderhorn Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C16 und C18 besonders stark vertreten, dabei war in der biotinsupplementierten Gruppe der Anteil dieser Fettsäuren bei den einfachen Lipiden deutlich höher.

In der vorliegenden Arbeit wurden die deutlichsten Unterschiede zwischen den Biotin- und den Kontrollkühen ebenfalls bei den einfachen Lipiden (Lipid 1) gefunden. Zu dieser Gruppe werden auch die Ceramide gezählt. Die Ceramide werden als die stärkste Gruppe der Lipide im Stratum corneum der Haut beschrieben (WEERHEIM u. PONEC, 2001; WERTZ, 2000 und 1997; ELIAS 1983; LAMPE et al., 1983; SCHNEIDER et al., 1983). Die Ceramide des Stratum corneum der Haut werden den Sphingolipiden zugeordnet und bestehen aus Sphingosin und hydroxylierten oder nicht-hydroxylierten Fettsäuren. Die nicht-hydroxylierten Fettsäuren (non-OH-FAME) können eine weitere Fettsäure binden, dabei handelt es sich häufig um Linolsäure, eine essentielle zweifach ungesättigte C18 Fettsäure (VIETZKE et al., 2001; STRYER, 1999; WERTZ et al., 1987 und 1985; WERTZ u. DOWNING, 1983).

Bei den nicht-hydroxylierten-Fettsäuren (non-OH-FAME) beider Lipidgruppen (Lipid 1 und Lipid 2) wurde in der Biotin-Gruppe ein höherer Anteil an ungesättigten C16 und besonders C18 Fettsäuren gefunden. Da im Rahmen dieser Arbeit die Fettsäuren in Gruppen zusammengefasst wurden, kann es sich um einfach-, aber auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren handeln.

## Diskussion

---

Das biotinabhängige Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert den entscheidenden Schritt in der Fettsäuresynthese. Es carboxyliert Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Bei der Kettenverlängerung der Fettsäuren ab C16 fungiert Malonyl-CoA zudem als C<sub>2</sub>-Donator (STRYER, 1999; LÖFFLER u. PETRIDES 1998; COOPER, 1993; BÄSSLER, 1992).

Denkbar wäre nun, dass Biotin als prosthetische Gruppe der Acetyl-CoA-Carboxylase innerhalb der Fettsäuresynthese Einfluss auf die Menge der synthetisierten Fettsäuren nimmt und somit mehr Fettsäuren zur Bildung der Ceramide zur Verfügung stehen. Die Ceramide mit nicht-hydroxylierten Fettsäuren (non-OH-FAME) könnten zusätzlich z. B. die essentielle Fettsäure Linolsäure (C18, zweifach ungesättigt) binden (VIETZKE et al., 2001; STRYER, 1999; WERTZ et al., 1987 und 1985; WERTZ u. DOWNING, 1983). Damit würde das Ceramidmolekül größer werden und im Interzellularspalt eine größere Stabilität bewirken. Somit hätte Biotin einen Einfluss auf den Interzellularkitt (Membrane Coating Material) und die Stabilität des Hornzellverbandes über die Fettsäurezusammensetzung. Dabei scheint die Länge der Fettsäuren zweitrangig zu sein, vielmehr die Qualität und Quantität innerhalb der Ceramide könnte entscheidend sein. Das würde bedeuten, dass je nach anatomischer Beanspruchung der Segmente oder auch im Falle von Krankheiten der Klaue unterschiedliche Ceramid-Muster zu finden sein müssten. HIGUCHI et al., (2005) fanden im Horn des Wandsegments der Rinderklaue vier verschiedene Ceramidgruppen und im Horn des Sohlensegments noch weitere drei Ceramidgruppen. Sie stellten zudem fest, dass der Gesamtgehalt an Ceramiden im Klauenhorn bei Kühen mit gesunden Klauen höher liegt, als bei Kühen mit subklinischer Lahmheit. Diese Feststellung unterstützt die oben angeführte Hypothese. Bisher konnten die Funktionen der einzelnen Ceramidgruppen nicht eindeutig geklärt werden. Daher ist es kaum möglich zu definieren, welche Ceramidgruppen und somit Fettsäuren für eine gute Hornqualität wünschenswert sind.

---

Wie oben beschrieben, wurde der deutlichste Unterschied zwischen den Biotin- und den Kontrolltieren bei den nicht-hydroxylierten Fettsäure-Methylestern (non-OH-FAME) der einfachen Lipide (Lipid 1) gefunden. Dabei fiel bei den Mittelwerten der Biotin- und Kontrollgruppe auf, dass in der Biotin-Gruppe die Fettsäuren mit einem signifikant höherem Anteil ungesättigt waren. In der Kontrollgruppe waren die gesättigten Fettsäuren mit einem höheren Anteil als in der Biotin-Gruppe vertreten. Dieser Sachverhalt könnte zu der Schlussfolgerung führen, dass Biotin Einfluss auf die Sättigung der Fettsäuren hätte. Da in der Literatur über den Einfluss von Biotin auf die Sättigung von Fettsäuren keine Angaben zu finden sind und die eigenen Untersuchungen nicht spezifisch genug waren, bleibt die Frage was Biotin im Zusammenhang mit der Sättigung bewirkt weiterhin unbeantwortet.

### **3 Schlussbemerkung**

Die Klauengesundheit hängt von vielen, äußeren und inneren Parametern ab. Die Hornqualität als ein Merkmal für die Klauengesundheit kann nur in einem multifaktoriellen Zusammenhang betrachtet werden. So wurden verschiedenste Methoden kombiniert, um dieser Tatsache gerecht zu werden. Eine weitere Problematik in der Erforschung der Wirkung von Biotin auf die Hornstrukturen liegt in der Schwierigkeit, histologische und zytologische Befunde zu objektivieren. Eine bessere Objektivierbarkeit solcher Befunde wurde in dieser Arbeit durch die verwendeten Bewertungsschlüssel erreicht.

Die klinischen Befunde dieser Arbeit bestätigen vorangegangene Untersuchungen über die positive Wirkung von Biotin auf die Klauengesundheit. Die PAS-Reaktion als semiquantitativer Nachweis von Glykoproteinen und -lipiden zeigte keine ausreichende Empfindlichkeit, um eine Biotinwirkung nachzuweisen. In der zytologischen Untersuchung der Ultrastrukturen wurden am Transmissionselektronenmikroskop deutliche Unterschiede im Interzellularkitt (Membrane Coating Material) und den intrazellulären Lipidtropfen festgestellt. Im Zusammenhang mit den in der Biotin-Gruppe vermehrt gefundenen Fettsäuren sind in dieser Arbeit zwei Wege aufgezeigt worden, über die Biotin Einfluss auf die Hornqualität und somit Klauengesundheit nehmen kann.

## Diskussion

---

Die feinkörnigere Kittsubstanz und die gleichzeitige Abnahme von intrazellulären Lipidtropfen bei den biotinsupplementierten Kühen spricht für einen Einfluss des Vitamins Biotin. Es ist anzunehmen, dass die intrazellulären Lipidtropfen als Energiereserve vermehrt abgebaut werden und somit der Zelle während der epidermalen Differenzierung mehr Energie zur Verfügung steht. Diese Energie könnte dann unter anderem für eine verstärkte Synthese der MCGs (Membrane Coating Granules) und des MCMs (Membrane Coating Material) genutzt werden. Da bei der Fettsäurezusammensetzung Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden wurden, ist ein Einfluss von Biotin auf die Fettsäurezusammensetzung naheliegend. So könnte die Fettsäuresynthese durch die Biotinwirkung beeinflusst werden. In der BiotinGruppe wurden unter anderem vermehrt C16 und besonders C18 Fettsäuren gefunden. Das spricht für eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung, die nicht ausschließlich in der Länge der Fettsäureketten zu suchen ist. Es ist durchaus denkbar, dass die Vermehrung bestimmter Fettsäuren die Zusammensetzung der Ceramide im Stratum corneum beeinflusst und somit zu einer besseren Hornqualität führen kann.

Diese vielfältigen Wege zeigen erneut auf, wie wichtig die einzelnen Parameter bei der Bestimmung der Hornqualität sind. Es besteht nach wie vor der Bedarf an weiteren Untersuchungen des Vitamins Biotin im Zusammenhang mit dem Klauenhorn. So konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, welche Fettsäuremuster für eine gesunde Klaue wünschenswert sind. Es sollte in künftigen Arbeiten untersucht werden, welches Lipidmuster (Ceramide) in welchem Segment an gesundes und widerstandsfähigeres Horn geknüpft ist. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Sättigung der Fettsäuren und der Biotinsupplementation gefunden. Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht ausreichend interpretiert werden. So sollte in folgenden Untersuchungen nicht nur auf die Lipidmuster und Fettsäurezusammensetzung ein Schwerpunkt gelegt werden, sondern auch auf die Sättigung der Fettsäuren näher eingegangen werden.

Nur durch weitere Forschung kann die vollständige Wirkung von Biotin auf die

---

Hornstrukturen aufgezeigt werden und im Zusammenhang mit den äußeren und inneren Faktoren sowie der Hornqualität geklärt werden. Nur im Gesamtzusammenhang kann geklärt werden, in welcher Form eine Biotinsupplementierung zur Verbesserung der Hornqualität führt, so dass unsere Kühe mit gesunden Klauen schmerzfrei leben können.