

D. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Bei der Beschreibung der Untersuchungsergebnisse wird so verfahren, daß jeweils erst die Situation beim gesunden Tier beschrieben wird. Anschließend folgen die Beobachtungen beim Biotinmangeltier, sofern sie von der gesunden Haut abweichen. Entsprechen sich die Befunde, wird dies nicht gesondert erwähnt.

1. KLINISCHE BEFUNDE

Die Tiere der Gruppe B sind gut genährt, lebhaft und nehmen interessiert an ihrer Umgebung teil. Ihr Federkleid ist sauber und glatt anliegend. Der Kot ist tierartsspezifisch geformt. Die Haut der Füße und die Gesichtshaut sind ohne besonderen Befund (Textabb. 2). Bei Tieren der Gruppe B liegen die Schuppen des Metatarsalballens, resp. die „reticulate scales“, dicht nebeneinander.



Textabb. 2: Drei Wochen altes Hühnerküken der Gruppe B, gefüttert mit einer

halbsynthetischen Biotinmangeldiät, der 500 µg Biotin/kg Futter zugesetzt wurde.

Die Tiere der Versuchsgruppe M wurden mit einer Biotinmangeldiät gefüttert, der zusätzlich Eiklar zugesetzt wurde. Der Gruppe K wurde nur die Biotinmangeldiät angeboten. Die Tiere der Gruppe M zeigen durchgehend einen schlechten Allgemeinzustand, während bei den Tieren der Gruppe K kein einheitliches Krankheitsgeschehen ausgebildet ist. Die Tiere der Gruppe M sowie die Tiere der Gruppe K, die ausgeprägte Symptome zeigen, weisen eine allgemeine Benommenheit auf, die durch ein Hängenlassen des Kopfes (Trauern) und durch völlige Teilnahmslosigkeit an ihrer Umgebung deutlich wird. Die Augen werden überwiegend geschlossen gehalten, und die Tiere geben kaum Lautäußerungen von sich. Das Brustbein ist hervorgetreten, was auf einen schlechten Ernährungszustand hinweist. Die Tiere der Versuchsgruppe M und ein Teil der Tiere der Gruppe K sind im Vergleich zur Gruppe B im Wachstum zurückgeblieben. Das Federkleid dieser Tiere ist verschmutzt und macht einen ungepflegten Eindruck. Weiterhin zeigen die Tiere der Gruppen M und teilweise die Tiere der Gruppe K eine mit Kot beschmutzte Kloake und setzen dünnflüssige Exkreme ab. Die Tiere atmen schwer mit geöffnetem Schnabel (Schnabelatmung).



Textabb. 3: Drei Wochen altes Küken der Gruppe M, das eine biotinfreie, halbsynthetische Diät mit 2% Eiklar erhalten hat. Es treten Läsionen in der Haut des Schnabelwinkels (Pfeilkopf) und der Fußhaut auf (→).

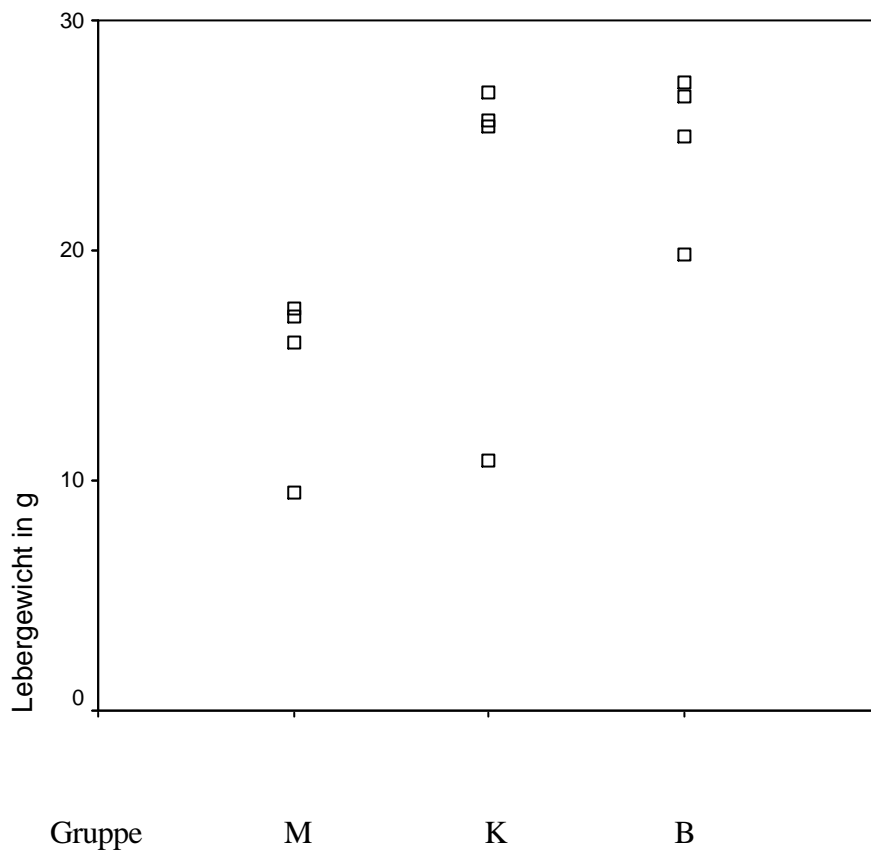
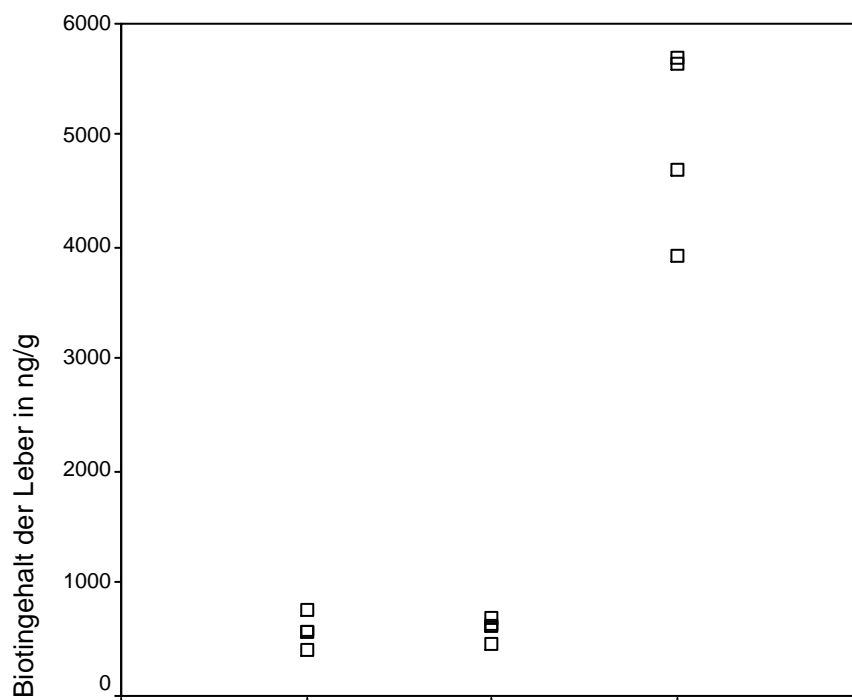
Die Haut der Mittelfußballen von Tieren der Gruppen M und K ist unterschiedlich stark verändert. Die Haut ist dunkel verfärbt und spröde. Die kleinen Schuppen dieser Ballen („reticulate scales“), auch Körnchen genannt, sind bei den stark veränderten Mittelfußballen -schon mit bloßem Auge erkennbar- durch tiefe Furchen deutlich voneinander getrennt (Abb. 1b). Diese Veränderungen sind bei den Tieren der Gruppe M einheitlich stark ausgeprägt, während die Tiere der Gruppe K unterschiedlich stark veränderte Ballen aufweisen. So treten stark veränderte Ballen wie in der Gruppe M, aber auch wenig veränderte oder mesoskopisch unveränderte Ballen auf. Auch in der Haut der Zehen treten bei Tieren der Gruppe M und zum Teil auch bei Tieren der Gruppe K dorsal und plantar tiefe Einrisse unterschiedlichen Ausmaßes auf (Textabb. 3), aus denen zum Teil ein blutiges Sekret hervortritt. Weiterhin kommen in den Gruppen M und K Umfangsvermehrungen im Bereich der Krallenansätze sowie Läsionen und Verkrustungen in der Haut der Schnabelwinkel- und Augenwinkelregion vor.

2. LABORBEFUNDE

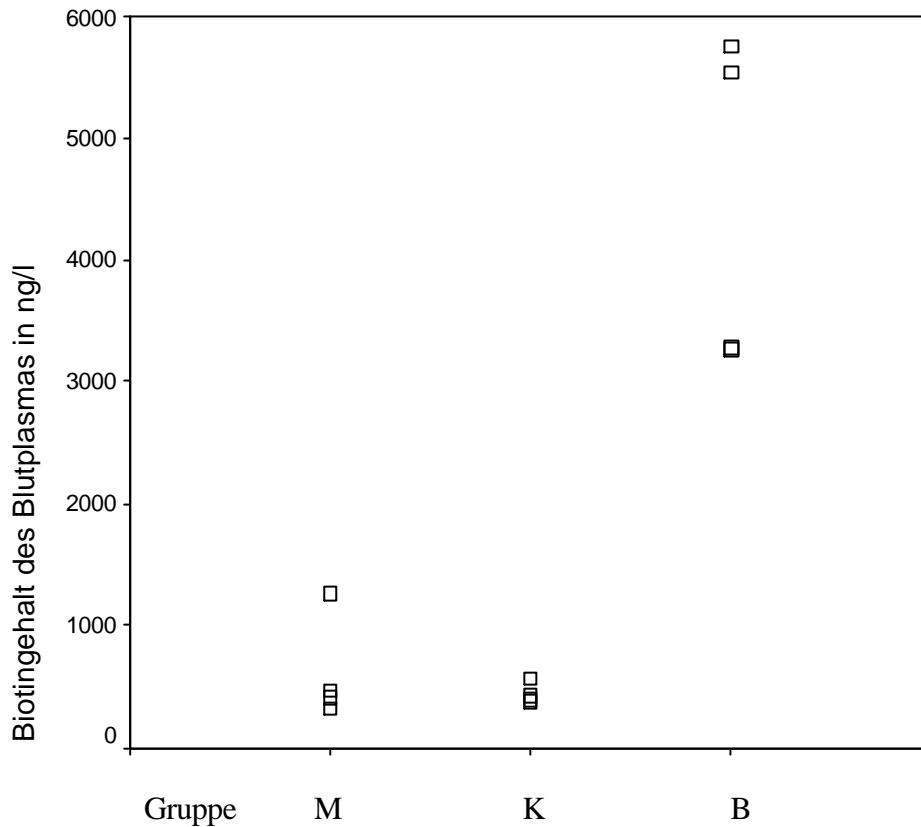
Zusätzlich zu der Hautprobenentnahme wurden jeweils die Leber und eine Blutprobe entnommen, um das Gewicht der Leber, ihren Biotingehalt sowie den Biotingehalt des Blutplasmas zu bestimmen. Die Analysen sind in den Laboratorien der Hoffmann - La Roche AG durchgeführt worden.

Tabelle 4: Laborergebnisse der untersuchten Tiere der Gruppen M (Biotinmangeldiät + Eiklar), K (Biotinmangeldiät) und B (Biotinmangeldiät + 500 µm Biotin/kg)

Tiere	Lebergewichte in g	Biotingehalt der Leber in ng/g	Biotingehalt des Blutplasmas in ng/l
M1	17,14	570	1265
M2	9,47	770	410
M3	17,52	560	470
M4	16,00	400	330
K5	10,85	700	400
K6	26,84	610	380
K7	25,64	450	440
K8	25,38	620	580
B9	24,92	3910	5550
B10	19,84	5690	5760
B11	27,30	4690	3290
B12	26,66	5630	3270

Graphik 1: Lebergewichte der untersuchten Tiere der Gruppen M, K und B**Graphik 2:** Leberbiotingehalte der untersuchten Tiere der Gruppen M, K und B

Gruppe M K B
Graphik 3: Plasmabiotingehalte der untersuchten Tiere der Gruppen M, K und B



3. BEFUNDE DER RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Rasterelektronenmikroskopisch untersucht wurden die Hautoberflächen sowie die Papillarkörperoberflächen und deren jeweils dazugehörigen epidermalen Äquivalente des Metatarsalballens („reticulate scales“) sowie des dorsalen Tarsometatarsus („scutate scales“).

3.1 Die „reticulate scales“

3.1.1 Die Oberfläche der „reticulate scales“

Die Schuppen an der Fußungsfläche („reticulate scales“) bei Tieren der Gruppe B stehen relativ eng beieinander und bilden eine kontinuierliche Oberfläche (Abb. 1a). Die Hornzellen schilfern in kleinen Schüppchen von der Hautoberfläche ab. Bei Küken mit einem Biotinmangel zeigt die Haut im Bereich der „reticulate scales“ die stärksten Hautveränderungen von allen untersuchten Lokalisationen. Diese sind bei den Tieren der Gruppe M und bei einigen Tieren der Gruppe K schon mit bloßem Auge zu erkennen. Deutlicher werden die äußerlichen Veränderungen der „reticulate scales“ der verschiedenen Gruppen durch den direkten Vergleich im Rasterelektronenmikroskop. Bei ausgeprägtem Biotinmangel sind die einzelnen körnigen Schuppen deutlich durch tiefe Furchen voneinander getrennt (Abb. 1b). Von den Oberflächen der einzelnen „reticulate scales“ lösen sich relativ große Stücke toten Hornmaterials ab. Außerdem sind in der Oberfläche der einzelnen „reticulate scales“ tiefe Zusammenhangstrennungen zu sehen (Abb. 1b).

Die dezenten Eindellungen der Schuppenoberfläche sind wahrscheinlich Artefakte durch den Schrumpfungsprozeß, der bei der Bearbeitung der Proben eintritt (Abb. 1a).

3. 1. 2 Der Papillarkörper und das epidermale Äquivalent der „reticulate scales“

Der Papillarkörper der „reticulate scales“ von Tieren der Gruppe B (Biotingruppe) zeichnet sich durch kuppelförmige, regelmäßig angeordnete Lederhautpapillen aus. Sie besitzen eine relativ breite Basis von ungefähr 470 µm und verjüngen sich nur gering in Richtung auf die Epidermis (Abb. 2a, 4a). Die Papillenhöhe beträgt zirka 250 µm. Jede Lederhautpapille weist auf ihrer Oberfläche kleine Untereinheiten auf, die folglich sekundäre Papillen genannt werden sollen (Abb. 2a).

Die Lederhautpapillen der Biotinmangeltiere sind stark verändert. Sie sind um das Drei- bis Vierfache länger als die Lederhautpapillen in der Schuppenhaut von biotin-supplementierten Tieren und reichen daher weit in die Epidermis hinein (Abb. 2b). Die Papillengrundfläche besitzt einen Durchmesser von ungefähr 360 µm und ist damit in der Regel kleiner als bei den Tieren der Biotingruppe. Die sekundären Papillen sind ebenfalls verlängert und in Richtung auf die Epidermis ausgerichtet. Sie besitzen eine Länge bis 183 µm, mit Durchmessern von zirka 25 bis 43 µm (Abb. 2b, 4b).

Die äquivalente Epidermisstruktur ist zum Papillarkörper kongruent. Somit beobachtet

man an der „inneren Epidermisoberfläche“ der biotinsupplementierten Tiere wenig ausgeprägte Vertiefungen zur Aufnahme der Lederhautpapillen. Die Aufsicht auf die innere Oberfläche der Epidermis gleicht einem Gefüge von Bienenwaben (Abb. 3a). Die Grenzen zwischen den Waben sind solide. Innerhalb der Waben sind viele kleine, wenig tiefe Einziehungen zur Aufnahme der sekundären Lederhautpapillen zu beobachten (Abb. 3a).

Die äquivalente Epidermisstruktur in der Haut von Biotinmangeltieren ist stark verändert. Die epidermalen Einziehungen zur Aufnahme der Lederhautpapillen sind sehr tief und reichen röhrenförmig in die Epidermis hinein (Abb. 3b). Die Durchmesser an der Basis der „epidermalen Röhren“ betragen etwa 450 µm. Die basalen Röhrenwände enthalten teilweise, die inneren Röhrenwände -soweit sie einsehbar sind- regelmäßig, sekundäre schmale Röhren zur Aufnahme der sekundären Lederhautpapillen (Abb. 3b). Die sekundären Röhren weisen an ihrer Basis zirka 40 µm große Durchmesser auf. Die Trennung der Epidermis von der Dermis gestaltete sich schwieriger als an der biotinsupplementierten Haut. Die Inkubation mußte daher auf etwa eine Stunde verlängert werden. Trotzdem enthalten die epidermalen Röhren teilweise Reste von Lederhautpapillen (Abb. 3b).

3.2 Die „scutate scales“

Eine rasterelektronenmikroskopische Darstellung der „scutate scales“ bringt im Vergleich zur makroskopischen Anschauung keine zusätzlichen morphologischen Erkenntnisse, so daß auf eine Beschreibung auf rasterelektronenmikroskopischer Ebene verzichtet wird.

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der „scutate scales“ von Biotinmangel- und biotinsupplementierten Tieren ergeben keine Unterschiede in der Struktur.

4. BEFUNDE DER LICHTMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN

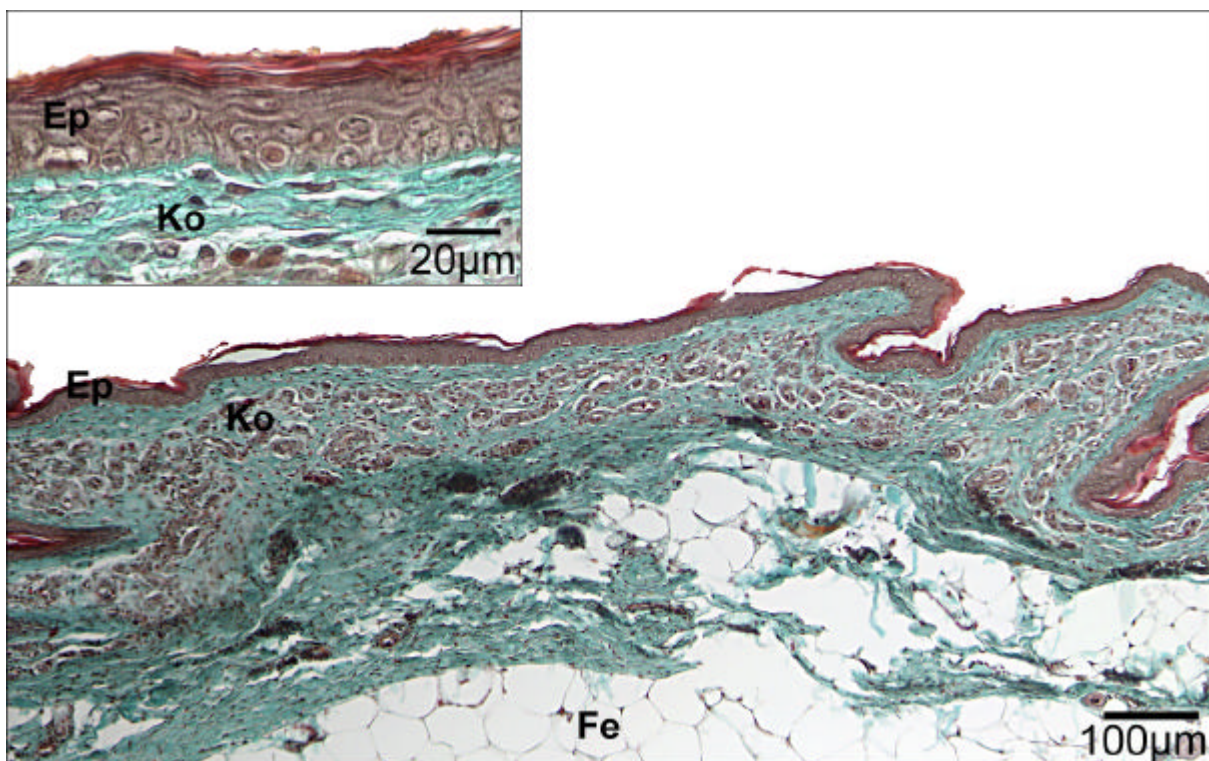
4.1 Allgemeine lichtmikroskopische Befunde der befiederten und unbefiederten Haut

Die befiederte (Brust und Rücken) und unbefiederte Haut (Schuppenhaut des Mittelfußes und des Mittelfußballens) besitzt zwei Anteile: Epidermis (Oberhaut) und Korium (Lederhaut). In der Epidermis, einem verhornenden, mehrschichtigen Plattenepithel, sind verschiedene Zellschichten zu erkennen. Sie bestehen aus verschiedengradig differenzierten Keratinozyten, die sich in ihrer Zellmorphologie, -histologie und Ultrastruktur unterscheiden. Die tiefste Schicht ist das Stratum basale. Mitotisch aktive Basalzellen bilden Keratinozyten, die im Laufe der physiologischen Regeneration zur Hautoberfläche wandern, sich dabei differenzieren und in Form von toten Hornschuppen abschilfern. Teilungsaktive Zellen besitzt nur das Stratum basale, das daher allein als Stratum germinativum (lat. germen: Keim, lat. germinare: hervorsprossen) bezeichnet werden sollte. Parabasalzellen, Tochterzellen der mitotisch aktiven Basalzellen, die nicht in der unmittelbaren Nähe der Basalmembran bleiben, bilden an einigen Hautstellen zusätzliche Zellreihen, die aus einem meist einlagigen stellenweise ein mehrlagiges Stratum basale entstehen lassen. Die sich in Richtung auf die Epidermisoberfläche anschließenden Zellschichten sind das Stratum intermedium, einschließlich des Stratum granulosum (sofern vorhanden) und des Stratum transitivum. In der vorliegenden Arbeit wird das Stratum transitivum nicht zum Stratum intermedium gezählt, da hier bereits gravierende Veränderungen als Folge der einsetzenden Verhornung stattfinden, die den Übergangszellen ihr charakteristisches Aussehen verleihen. Ein Stratum granulosum konnte in allen untersuchten vier Hautstellen lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Das Stratum corneum, bestehend aus toten verhornten Zellen, ist die äußerste Schicht der Epidermis. Das Korium unterlagert die Epidermis. Beide sind durch die Basalmembran voneinander getrennt, die sich im lichtmikroskopischen Bild deutlich PAS-positiv abhebt. Das Korium besteht aus zwei Schichten: dem Stratum papillare, das direkt der Basalmembran anliegt und dem Stratum reticulare, das sich in der Tiefe anschließt. Durch den direkten Vergleich der

adäquaten Hautstellen von Biotinmangel- und biotinsupplementierten Tieren sowie der Untersuchung des Ausmaßes biotinmangelbedingter Hautveränderungen innerhalb der Mangelgruppe auf die verschiedenen Hautareale, werden für einen Biotinmangel charakteristische strukturelle, ultrastrukturelle und histochemische Veränderungen der Hühnerhaut und die Empfindlichkeit verschiedener Hautlokalisationen gegenüber einem Biotinmangel dargestellt. Bei der Beschreibung der histologischen und histochemischen Befunde wird so verfahren, daß für jeden Nachweis zuerst die physiologische, also die gesunde Haut, von biotinsupplementierten Tieren beschrieben wird und anschließend die Beobachtungen in der Haut von Biotinmangeltieren, sofern sie von der gesunden Haut abweichen. Entsprechen sich die Befunde, wird dieses im allgemeinen nicht gesondert erwähnt.

4. 1. 1 Die befiederte Haut

Beide Hautstellen (Rücken- und Brusthaut) werden zusammen beschrieben, da nur geringe morphologische Unterschiede und keine Unterschiede in den Ergebnissen der durchgeführten histochemischen Nachweise vorliegen. Es wurden folgende Färbungen und histochemische Nachweise durchgeführt: H. E. (Hämalaun/Eosin) - Übersichtsfärbung, Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER, die Feulgensche-Nuklealreaktion, Nachweise von Zuckerresten (PAS-Reaktion), von Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken mit der DDD-Reaktion sowie Enzymnachweise der sauren Phosphatase, der Thiaminpyrophosphatase und der Adenosintriphosphatase.

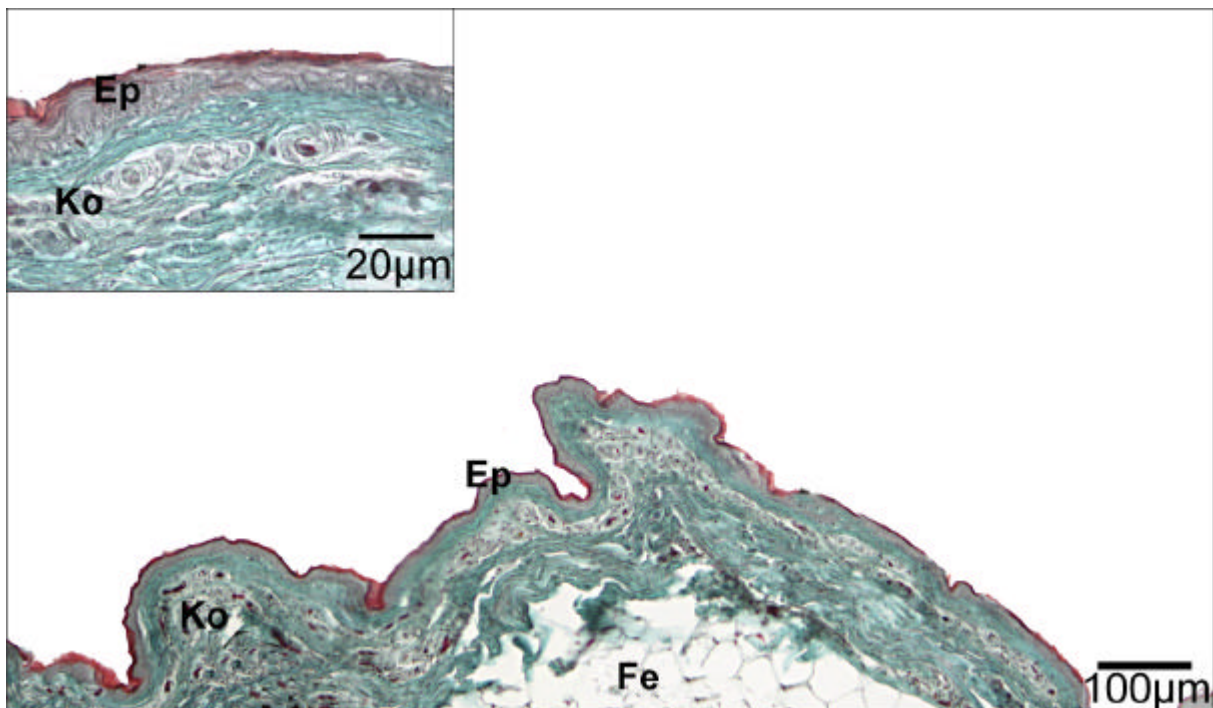


Textabb. 4: Brusthaut, Paraffinschnitt, Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER, **Ep** = Epidermis, **Ko** = Korium (Lederhaut); **Fe** = Fettgewebe in der Subkutis (Unterhaut)

Die befiederte Haut ist sehr dünn. Die gesamte Epidermis der Brust- und Rückenhaut hat eine Dicke von ungefähr 12 bis 15 µm. Die epidermale Matrix (gesamte Epidermis ohne Stratum corneum) besitzt eine Dicke von zirka 9 bis 10 µm und besteht aus 4 bis 6 Zellagen. Die Anzahl der Zellreihen des Stratum corneum ist auf lichtmikroskopischem Niveau durch die Bildung von „hauchdünnen“ Hornlamellen nicht bestimmbar. Das Stratum basale besteht aus einer einzelnen Reihe von relativ großen, meist

hochprismatischen Zellen. Sie besitzen einen zentral gelegenen, prominenten Zellkern (Nukleus), der einen Großteil des Zellinneren einnimmt. Die Kern-Plasma-Relation beträgt etwa zwei zu eins. Die drei bis fünf darüber liegenden Zellreihen bilden das Stratum intermedium. Sie flachen immer mehr ab, je weiter sie sich der Hautoberfläche annähern. Die Form des Zellkerns entwickelt sich der Zellform entsprechend über ein anfangs rundes bis hin zu einem querovalen Aussehen.

In den *Hämatoxylin/Eosin*-gefärbten Hautpräparaten weisen die Zellkerne der gesamten lebenden Epidermis eine gleichermaßen starke Basophilie (Blaufärbung) auf. Das Zellplasma der lebenden Epidermis ist einheitlich azidophil und weist in keiner Zellschicht basophile Strukturen auf, d. h. ein Stratum granulosum ist lichtmikroskopisch nicht nachweisbar. Das kernlose Stratum corneum besteht aus Hornlamellen, die zur Oberfläche hin hauchdünn werden. Die Hornschicht färbt sich nur schwach eosinophil (rot) an oder bleibt völlig ungefärbt. Das Stratum corneum der Federanschnitte ist dagegen leuchtend rot gefärbt.



Textabb. 5: Rückenhaut, Paraffinschnitt, Trichromfärbung nach MASSON-GOLDNER, **Ep** = Epidermis, **Ko** = Korium (Lederhaut); **Sk** = Subkutis (Unterhaut); **Fe** = Fettgewebe, zirka. 120fach vergrößert, Einsatz: zirka 500fach vergrößert.

Bei der *Trichromfärbung* nach MASSON-GOLDNER zeigt sich die lebende Epidermis rot gefärbt, ebenso färbt sich hier das Stratum corneum der Oberhaut und der Federanschnitte leuchtend rot. In den histologischen Präparaten ist der Zusammenhalt am Übergang vom Stratum corneum zu den lebenden Zellschichten und zwischen den Hornlamellen häufig unterbrochen.

In der *Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion* wird die Basalmembran zwischen der Epidermis und dem Korium in Form einer stark positiv reagierenden Grenzlinie dargestellt. Ebenfalls deutlich positiv reagiert der Hauptanteil des Korium. Die lebende Epidermis ist intra- und extrazellulär PAS-negativ. Die Zellgrenzen des Stratum corneum reagieren hingegen schwach PAS-positiv und heben sich durch die negativen Zellinhalte ab. Intrazelluläre PAS-positive Granula, wie sie später bei den Schuppenhäuten beschrieben werden, sind nicht darstellbar.

Unterschiede zwischen diastaseinkubierten und nicht diastaseinkubierten Hautproben konnten nicht festgestellt werden.

Beim *Nachweis der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen)* zeigen die lebenden Epidermiszellen intra- und extrazellulär eine schwach positive (rosa) Reaktion, die Zellen der oberen Spinosazellschicht und des Stratum transitivum besitzen deutlich hervortretende positive Zellgrenzen. Demgegenüber zeigt die Hornschicht insgesamt eine starke positive Reaktion (violett). Die Disulfidbrücken (SS-Gruppen) und die Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) haben ein identisches Verteilungsmuster.

Beim lichtmikroskopischen *Nachweis der sauren Phosphatase* nach LOJDA (1962) werden die enzymatisch-aktiven Stellen rot gefärbt. Die Gewebeschnitte besitzen durchgehend eine unspezifische Gelbfärbung des Schnittuntergrundes, was durch die ebenfalls gelbstichigen Kontrollschnitte deutlich wird. Vereinzelt treten intrazelluläre positive Reaktionen auf, die sich auf das Stratum basale und der unmittelbar darüberliegenden Zellage beschränken. Die restliche Epidermis reagiert negativ. Die Lederhaut reagiert generell stärker positiv als die Epidermis. Leuchtend rote, feinkörnige Niederschläge sind in relativ großer Dichte in den Fibroblasten und den En-

dothelzellen anzutreffen.

Der *Thiaminpyrophosphatase-Nachweis* nach NOVIKOFF und GOLDFISCHER (1961) fällt in der gesamten Epidermis und im Korium der Brust- und Rückenhaut beider Versuchstiergruppen negativ aus.

Beim Nachweis der *Adenosintriphosphatase* mit der Bleisalz-Methode nach WACHSTEIN und MEISEL (1957) zeigt sich im Stratum basale der biotinsupplementierten Tierhaut eine positive Reaktion im Bereich der Zellgrenzen. Die übrigen Epidermisschichten zeigen keine Reaktion. Die Lederhaut reagiert im allgemeinen viel stärker als die Epidermis. In der Epidermis der Mangeltiere ist kein Aktivitätsnachweis zu erbringen. In der Lederhaut fällt der Enzymnachweis bei Mangeltieren schwächer aus als bei biotinsupplementierten Tieren.

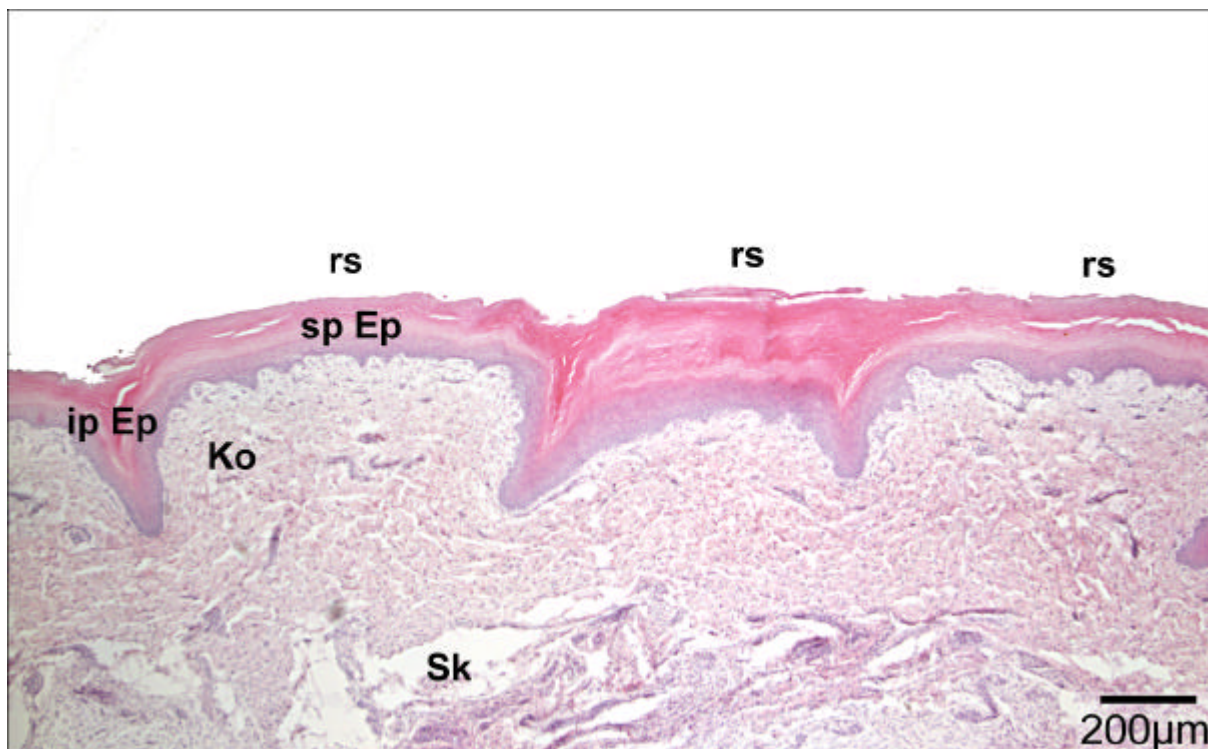
4. 1. 2 Die unbefiederten Schuppenhäute

Die Schuppenhautproben wurden mit folgenden Nachweismethoden untersucht:

H. E. - Übersichtsfärbung, Trichromfärbung nach MARINOTTI, Feulgensche Nuklealreaktion sowie Nachweise von Zuckerresten (PAS-Reaktion), Sulfhydrylgruppen und Disulfidbrücken (DDD-Reaktion), Histidinnachweis, Fettfärbungen und -differenzierung mit Sudanschwarz B bzw. Nilblausulfat, Keratinnachweis mit Rhodamin-B sowie Enzymnachweise der sauren Phosphatase, der Thiaminpyrophosphatase und der Adenosintriphosphatase.

Die Schuppenhaut des Mittelfußballens (Region der „reticulate scales“)

Die Schuppenhautepidermis des Mittelfußballens hat die stärkste Dicke der untersuchten Hautlokalisationen. Das Stratum papillare der Lederhaut bildet hier einen kräftig ausgeprägten Papillarkörper aus.



Textabb. 6: Mittelfußballen, resp. Bereich der „reticulate scales“, Kunststoffschnitt (Technovit 7100®), H. E., suprapapilläre Epidermisabschnitte (**sp Ep**), interpapilläre Epidermis (**ip Ep**), Korium (**Ko**), Subkutis (**Sk**), „reticulate scales“(**rs**)

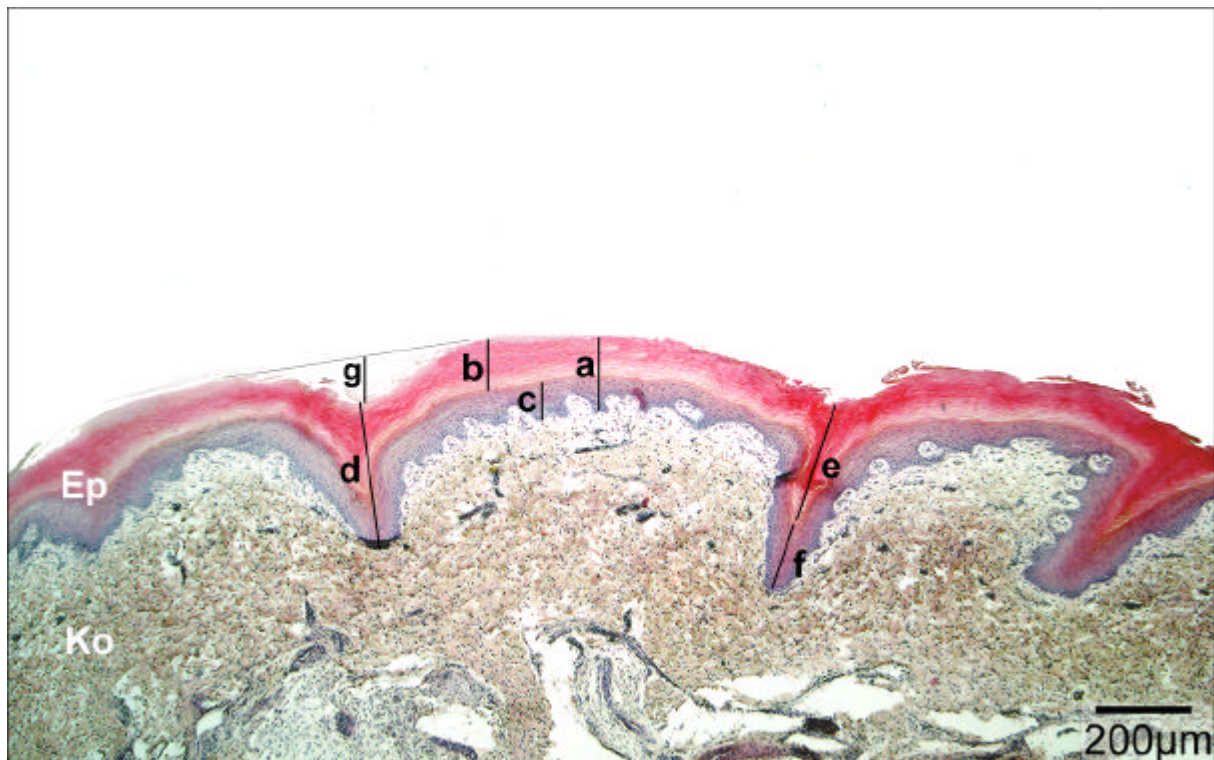
Bei den untersuchten biotinsupplementierten Tieren schwankt die Epidermisdicke im

Bereich der Schuppen zwischen 136 und 185 μm , mit einem durchschnittlichen Meßwert von 160 μm . Die Hornschicht nimmt davon eine Dicke von durchschnittlich 102 μm ein mit einer Variationsbreite von 95 bis 109 μm . Die interpapilläre Epidermis ist dicker. Sie mißt durchschnittlich 461 μm mit einer Variationsbreite von 370 bis 590 μm . Das Stratum corneum hat daran einen Anteil von durchschnittlich 368 μm (Variationsbreite 287 bis 462 μm). Die Hautfurchen zwischen den „reticulate scales“ sind zirka 160 μm tief. Die durchschnittliche Zellteilungsrate beträgt eine Mitose auf 120 Basalzellen.

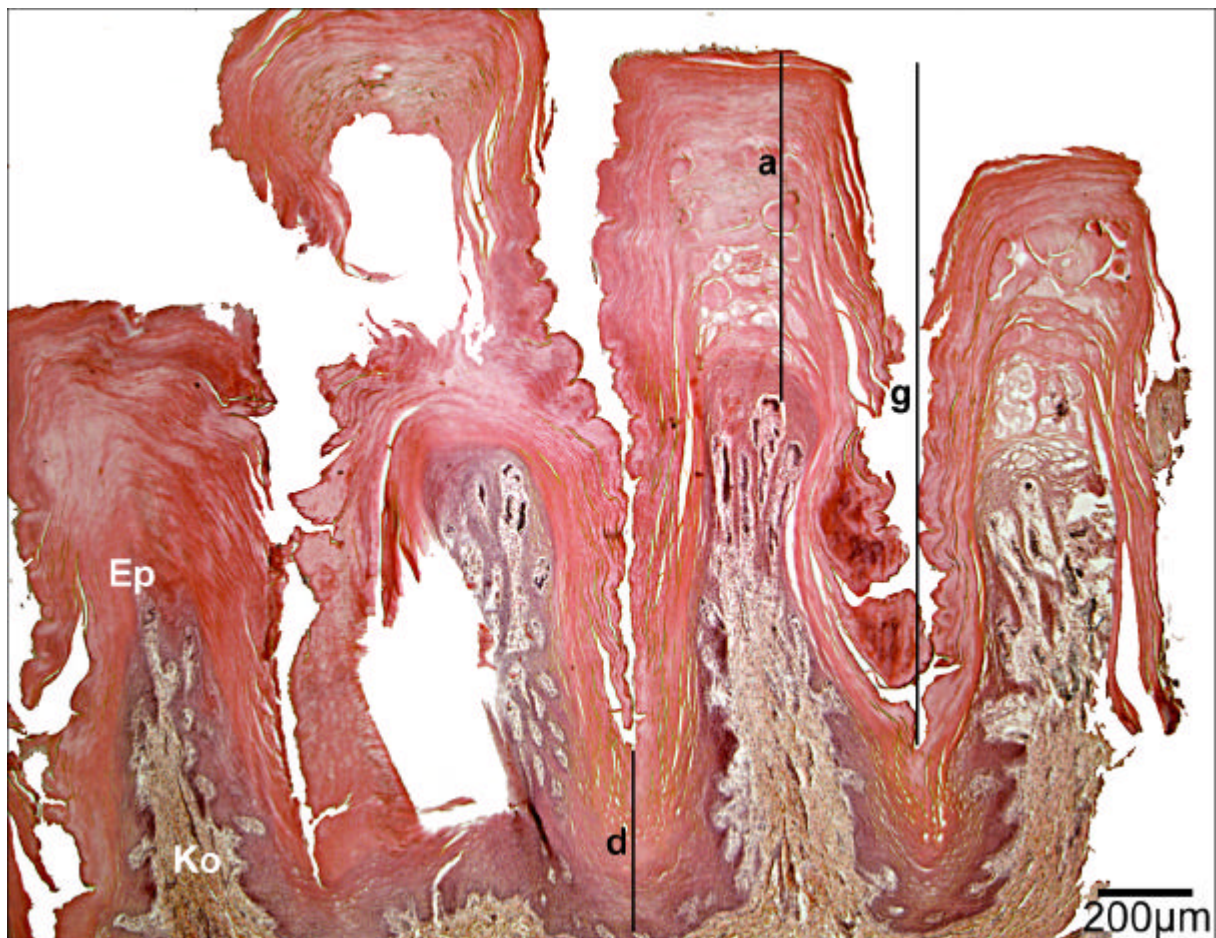
Die Epidermis der Biotinmangeltiere ist stark verdickt (Abb. 4b). Sie ist gekennzeichnet durch stark verdickte, suprapapilläre Abschnitte im Bereich der Schuppen und durch tiefe Furchen in den Zwischenschuppenarealen. Die warzenartig veränderten epidermalen Abschnitte sind im Verhältnis 1:1 über den verlängerten Lederhautpapillen angeordnet. Die Epidermisdicke beträgt hier durchschnittlich 805 μm (Variationsbreite 700 bis 950 μm), wobei das Stratum corneum daran einen Anteil von durchschnittlich 245 μm (Variationsbreite 240 bis 340 μm) hat. Die interpapillären Epidermisabschnitte sind durchschnittlich 400 μm (Variationsbreite 360 bis 480 μm) dick, wobei auf das Stratum corneum durchschnittlich 250 μm entfallen. Die Furche zwischen zwei warzenförmigen, suprapapillären Epidermisabschnitten hat bei Mangeltieren eine Tiefe bis 1500 μm . Die Mitoserate ist bei Mangeltieren, mit einer Mitose auf 32 Basal- und Parabasalzellen, erhöht. Die stark zergliederten Lederhautpapillen sind stark vergrößert und reichen weit in die Epidermis vor. Sie sind gekennzeichnet durch eine große Anzahl von Anschnitten großkalibriger Blutkapillaren, die größtenteils mit Serum und Erythrozyten angefüllt sind.

Tabelle 5: Exemplarische Darstellung der Dimensionen in der Epidermis der „reticulate scales“ eines repräsentativen histologischen Schnittes (Textabb. 7)

Epidermis des Tarsometatarsalballens / <u>Gruppe B</u> (Textabb. 7a)						
im Bereich der Schuppen (suprapapillär) in μm			im Bereich zwischen den Schuppen (interpapillär) in μm			Tiefe der Furche zwischen den Schuppen in μm
a	b	c	d	e	f	g
154	108	77	292	246	154	92
Epidermis des Tarsometatarsalballens / <u>Gruppe M</u> (Textabb. 7b)						
a	b	c	d	e	f	g
744	192	544	384	256	144	1440



Textabb. 7a: Darstellung der gemessenen Strecken in einem Schnitt durch den Mittelfußballen eines biotinsupplementierten Hühnerküchens der Gruppe B, Paraffinschnitt, H. E.



Textabb. 7b: Schnitt durch den Mittelfußballen eines biotindefizitären Hühnerküken (Gruppe M) Paraffinschnitt, H. E.

- Strecke a) suprapapilläre Epidermisdicke (im Bereich der Schuppen)
- Strecke b) Stratum corneum im Bereich der Schuppen
- Strecke c) lebende Epidermis (suprapapillär) unterhalb der Schuppen
- Strecke d) gesamte Epidermis im Bereich zwischen den Schuppen
- Strecke e) Stratum corneum im Bereich zwischen den Schuppen
- Strecke f) lebende Epidermis im Bereich zwischen den Schuppen
- Strecke g) Tiefe der Epidermisfurche zwischen zwei Epithelleisten

Bei der *H. E.* - Färbung zeigt die lebende Epidermis des gesunden Mittelfußballens eine geringe Azidophilie, die in Richtung auf die Hautoberfläche mäßig zunimmt. Das Stratum corneum läßt durchgängig eine starke Azidophilie erkennen. Im Stratum basale wird eine geringgradige Basophilie beobachtet, die in Richtung auf die Hautoberfläche

abnimmt. Die Kerne der lebenden Epidermis sind basophil. Die Intensität der Hämatoxylinfärbung nimmt zur Oberfläche hin ab.

Die Epidermis der biotindefizitären Tiere weist ausschließlich im Bereich der warzenförmig veränderten, suprapapillären Epidermisabschnitte im mittleren und oberen Stratum intermedium, Stratum transitivum und im Bereich der jungen Hornzellen klein- bis großblasige Strukturen mit einem gemessenen maximalen Durchmesser von 33 µm auf (Abb. 4b), die in der Epidermis von biotinsupplementierten Tieren nicht vorkommen. Diese blasigen Auftreibungen in der Epidermis kommen nicht in den interpapillären Epidermisabschnitten der biotindefizitären Tiere vor. Die warzenförmig veränderten epidermalen Bereiche zeigen bei der H. E.-Färbung unterschiedliche Anfärbbarkeit. So reagieren die Auftreibungen innerhalb der Epidermis schwächer azidophil als die sie umgebenden Zellen (Abb. 4b). Weiterhin zeigt diese veränderte Region keine Reaktion auf das basophile Hämalaun.

Die *PAS-Reaktion* in der Haut der „reticulate scales“ biotinversorgter Tiere weist eine deutlich positive Reaktion der Basalmembran auf. Die darüberliegenden Zellen und Interzellularräume des Stratum basale und des unteren Drittels des Stratum intermedium reagieren PAS-negativ. In den oberen zwei Dritteln des Stratum intermedium und im Stratum transitivum kommen intrazellulär feinkörnige, in den sich unmittelbar anschließenden jungen Hornzellen fein- bis grobkörnige, PAS-positive Granula (Abb. 6b) vor, die in Richtung auf die Oberfläche mengenmäßig zunehmen. Die Interzellularräume oberhalb des Stratum intermedium reagieren gering bis mäßig positiv auf den PAS-Nachweis. Diese PAS-positiven, intrazellulär gelegenen, diastasestabilen Granula fehlen völlig in der gesamten Epidermis des Mittelfußballens von biotindefizitären Tieren (Abb. 6c, 6d). Die bereits beschriebenen blasigen Erweiterungen in den warzenförmig veränderten Abschnitten der Epidermis reagieren teils PAS-positiv und teils PAS-negativ. Ein Unterschied zwischen diastaseinkubierten und nicht diastasebehandelten Hautproben kann nicht festgestellt werden.

Der Keratinnachweis mit *Rhodamin B* an den Hautproben der biotinsupplementierten Tiere verläuft in der lebende Epidermis negativ. Die Hautproben färben sich durch Toluidinblau als Gegenfärbung blau an, wobei die Basalzellen eine intensivere Reaktion

aufweisen als die darauffolgenden lebenden Epidermiszellschichten. Das tiefste Drittel des Stratum corneum bleibt ungefärbt und die darüberliegenden zwei Drittel der Hornzellschicht sind leuchtend purpurfarben und reagieren damit positiv auf den Keratinnachweis. Bei den biotindefizitären Tieren ist der mit blasigen Auftreibungen veränderte Bereich der lebenden Epidermis und der jungen Hornzellen weder blau noch purpur anfärbbar, sondern zeigt sich, wie auch schon bei der H. E.-Färbung chromophob. Auch das alte Stratum corneum der Proben von biotindefizitären Tieren färbt sich nur gering purpurfarben an.

Der *Sulfhydrylgruppen-Nachweis* ergibt bei biotinsupplementierten Tieren im Stratum basale und Stratum intermedium eine mittelgradig bis stark positive Reaktion. Das Stratum transitivum und das Stratum corneum reagieren stark bis sehr stark auf den Nachweis von SH-Gruppen. Der *Disulfidbrücken-Nachweis* im Stratum basale und Stratum intermedium ist schwach bis mittelgradig und nimmt im Stratum transitivum und Stratum corneum auf eine einheitlich starke Reaktion zu.

In Hautproben von biotindefizienten Tieren zeigt das Stratum corneum eine eindeutig schwächer positive Reaktion auf den SH-Gruppenachweis als bei biotinsupplementierten Tieren.

Die *Sudanschwarz B-Färbung* weist bei biotinsupplementierten Tieren im Stratum basale eine schwache Fettreaktion auf, die jedoch in Richtung auf die Oberfläche bis zum Stratum transitivum stetig zunimmt (Abb. 7a). Mit *Nilblausulfat* werden diese Fette blau gefärbt und damit als saure Lipide erkannt. Im Stratum corneum nimmt die Fettmenge wieder geringfügig ab. Die Nilblausulfat-Reaktion färbt die Hornzellschicht diffus blau-rosa (Abb. 7d) an, was die Zunahme an neutralen Lipiden und damit eine Änderung im Fettmuster während der Verhornung anzeigt. Bei den Tieren mit Biotindefizienz ist der Gehalt an epidermalem Fett in den Zellen der Spinoso- und der Transitiumzellschicht der „reticulate scales“ geringer. Die blasigen Erweiterungen sind teilweise homogen hellgrau gefärbt oder ungefärbt. Es fällt insbesondere auf, daß das Stratum corneum keinen rosafarbenen Anteil und damit keine erkennbaren Zunahmen an neutralen Lipiden aufweist im Gegensatz zu biotinsupplementierten Tieren (Abb. 7d).

Der *Histidinnachweis* fällt sowohl bei Mangel- als auch bei supplementierten Tieren in den Basalzellen und in den unmittelbar darauffolgenden Spinosazellen negativ aus. Die darüberliegenden Schichten der lebenden Epidermis reagieren mäßig bis stark positiv. Die Erythrozyten in der Lederhaut reagieren stark auf den *Histidinnachweis*. Die für einen Biotinmangel pathognomonischen groß- bis kleinblasigen Auftreibungen im oberen Stratum intermedium, im Stratum transitivum und im unteren Abschnitt des Stratum corneum der warzenartig verformten Epidermisabschnitte, sind teils deutlich Histidin-positiv und teils schwach positiv. Die Lederhaut der biotindefizitären Tiere ist durch zahlreiche, weite Kapillaranschnitte mit deutlich braun-schwarz gefärbten roten Blutkörperchen charakterisiert. Des Weiteren kommen zahlreich Mastzellen vor, deren Granula ebenfalls braun-schwarz gefärbt sind.

Der Nachweis der *Adenosintriphosphatase* zeigt eine mäßige Aktivität im Stratum basale und eine weiter abnehmende Reaktion bis zum mittleren Stratum intermedium. Darüber verläuft die Reaktion negativ. Bei Biotindefizienz zeigt sich kein wahrnehmbarer Aktivitätsverlust.

Die *Thiaminpyrophosphatase* besitzt im Stratum basale und im unteren Drittel des Stratum intermedium eine geringe Aktivität, die durch vereinzelte, punktförmige schwarze und perinukleär gelegene Reaktionsprodukte nachweisbar ist. Sie nimmt in den darüberliegenden Schichten bis zum Stratum transitivum zu, was sich durch eine Zunahme der Dichte an schwarzen Reaktionsprodukten ablesen läßt. Das Stratum corneum reagiert hingegen negativ. Die Epidermis von biotindefizitären Tieren reagiert völlig negativ auf den Thiaminpyrophosphatase-Nachweis im Gegensatz zur Epidermis der biotinsupplementierten Tiere.

Die Aktivität der *sauren Phosphatase* in der Haut von biotinsupplementierten Tieren ist im Stratum basale schwach und in den darüberliegenden Epidermisschichten nicht nachzuweisen. Die Lederhaut besitzt eine generell stärkere Aktivität der sauren Phosphatase als die Epidermis. Eine große Dichte an leuchtend roten Niederschlägen finden sich in den Fibrozyten und den Gefäßendothelien. Bei den biotindefizitären Tieren ist neben dem Stratum basale auch noch in dem sich anschließenden Stratum

intermedium ein geringer Aktivitätsnachweis zu verzeichnen. Ein Aktivitätsunterschied im Bezug auf den Biotinstatus ist in der Lederhaut nicht festzustellen.

Die dorsale Schuppenhaut am Mittelfuß (Region der „scutate scales“)

Die dorsal gelegene Schuppenhaut am Tarsometatarsus ist mit "scutate scales" (Quertafeln) bedeckt. Sie zeichnet sich durch das Auftreten einer äußeren und einer inneren Epidermisoberfläche aus, die über eine Scharnierregion („hinge“) miteinander verbunden sind (Textabb. 8). Die äußere Epidermis besitzt eine Dicke von 17,0 bis 17,5 μm , wobei das Stratum corneum allein ein Ausmaß von ungefähr 14,0 μm einnimmt. Die epidermale Matrix umfaßt 16 bis 19 Zellreihen. Die lebende Epidermis der inneren Epidermisoberfläche und der Scharnierregion besitzt eine Dicke von ungefähr 2 bis 3 μm . Im Gegensatz zum Stratum corneum der äußeren Epidermis, die eine kompakte Struktur ohne größere Lücken im Hornzellgefüge aufweist, ist das Stratum corneum der inneren Epidermis und der Scharnierregion sehr locker angeordnet und läßt sich daher nur ungenau vermessen.



Textabb. 8: Schuppenhaut dorsal am Tarsometatarsus, resp. Bereich der „scutate scales“, mit einer äußeren Epidermisoberfläche (**äEp**) und einer inneren Epidermisoberfläche (**iEp**). Beide sind durch die Scharnierregion (hinge, **h**) verbunden. Kunststoffschnitt, Sagittalschnitt, H. E., Korium (**Ko**)

In der äußeren Epidermis zeigen das Stratum basale und das untere Drittel des Stratum intermedium kaum *eosinophiles* Färbeverhalten. Das Zellplasma des oberen Drittels des Stratum intermedium und des Stratum transitivum ist dagegen stärker eosinophil und enthält kleine, stark abgeflachte und stark basophile Kerne. Das Stratum corneum

reagiert schwach eosinophil. Die gesamte innere Epidermis und die Epidermis der Scharnierregion zeigen durch alle Epidermisschichten hindurch eine mittelstark azidophile Reaktion. In Hautproben der „scutate scales“ von Biotinmangeltieren reagiert das Stratum corneum der inneren Epidermisoberfläche und der Scharnierregion stärker eosinophil als bei biotinsupplementierten Tieren. Im Bereich der basalen und mittleren Hornzellschicht treten morphologische Veränderungen in Form eosinophiler, blasiger Gebilde auf. Ihre Lokalisation, ob intra- oder extrazellulär, ist im lichtmikroskopischen Präparat nicht zu klären. Weiterhin treten im Stratum corneum der inneren Epidermis bei den Biotinmangeltieren basophil reagierende, kleine Kernreste auf.

In der äußeren Epidermis befinden sich intrazelluläre, diastases stabile, PAS-positive Granula in den Zellen des Stratum transitivum und in den direkt darüberliegenden jungen Zellagen des Stratum corneum. Die intrazellulären PAS-positiven Reaktionsprodukte in den Zellen des oberen Drittels der lebenden Epidermis fehlen in den Hautproben der „scutate scales“ der Biotinmangeltiere.

Die *Rhodamin B-Färbung* nach LIISBERG (1968) dient der spezifischen Darstellung von Keratinen, die sich purpur anfärben. Die äußere Epidermis der „scutate scales“ reagiert im Bereich der lebenden Epidermis einheitlich negativ, leuchtend purpurfarben zeigt sich der Großteil des Stratum corneum. Nur ein schmaler Streifen im Bereich der Verhornungsgrenze bleibt farblos. Das Stratum corneum der inneren Epidermis und der Scharnierregion dagegen bleiben völlig ungefärbt, während die lebende Epidermis dieser Abschnitte gleichermaßen negativ reagiert wie auch in der äußeren Epidermis. In den Biotinmangelproben reagiert das Stratum corneum der inneren Epidermis und der Scharnierregion positiv auf den Keratinnachweis. Im Gegensatz dazu reagiert die Hornschicht dieser Regionen bei biotinsupplementierten Tieren negativ.

Die *Sulphydrylgruppen (SH-Gruppen)* sind in der äußeren Epidermis sowie in der inneren Epidermis und der Scharnierregion gleichermaßen verteilt. Im Stratum basale und den tiefen zwei Dritteln des Stratum intermedium ist nur eine geringe Konzentration an SH-Gruppen vorhanden. Die darüberliegenden Schichten weisen hingegen eine einheitliche, deutlich stärkere Reaktion auf. Bei Biotinmangel tritt kaum eine

Veränderung dieser Verhältnisse auf. Die Verteilung und Konzentration der *Disulfidbrücken (SS-Gruppen)* stimmen mit denen der SH-Gruppen in der äußeren Epidermis der „scutate scales“ nahezu überein. Anders im Bereich der inneren Epidermis und der Scharnierregion, wo durch die gesamte Epidermis hindurch nur eine geringe Reaktion auf den SS-Gruppennachweis erfolgt. Bei Biotinmangel fällt die Reaktionsstärke auf diese Nachweise (SS-Gruppen und SH-Gruppen) in allen drei Epidermisabschnitten der „scutate scales“ im allgemeinen gleichstark oder geringfügig stärker aus. Nur im mittleren Drittel des Stratum intermedium der inneren Epidermis und der Scharnierregion tritt eine deutlich stärkere Reaktion beim SS-Gruppennachweis, im Vergleich mit der adäquaten Zellschicht bei biotinsupplementierten Tieren, auf.

Mit der *Sudanschwarz-Färbung* läßt sich in der äußeren Epidermis eine Vielzahl von Fetttropfen in den hochprismatischen Basalzellen (Abb. 8a, b) darstellen, die sich regelmäßig im basalen Teil der Zellen befinden. Der Zellkern liegt meistens dezentral in der oberen Hälfte der Basalzelle. Die Fetttropfen nehmen abrupt in ihrer Zahl im Stratum intermedium ab (Abb. 8b) und kommen bis zur Hautoberfläche nur noch in geringer Anzahl vor. In der inneren Epidermis und in der Scharnierregion kommen Fetttropfen in mäßiger Anzahl vor und sind durch die gesamte Epidermis gleichmäßig verteilt (Abb. 8a, c).

Durch den *Nilblausulfat-Nachweis* werden die Fetttropfen in den Basalzellen der gesamten äußeren Epidermis rotviolett gefärbt, was sie teils als neutrale, teils als saure Lipide identifiziert. Die darüberliegende Epidermis ist einheitlich blau gefärbt, enthält also nachweislich saure Lipide. Die Scharnierregion und die innere Epidermis sind einheitlich blau und damit als neutrale Lipide durch die gesamte Epidermis hindurch gekennzeichnet. Bei einem Biotinmangel kommt es zu einer Zunahme an neutralen Fetttropfen in den tieferen Schichten, insbesondere der Basalzellschicht der äußeren Epidermis der „scutate scales“. Im Laufe der Differenzierung nehmen diese zwar erheblich ab, sind jedoch im Vergleich zu der gesunden Haut der „scutate scales“ zahlenmäßig vermehrt.

Der *Histidinnachweis* ergibt in der gesamten lebenden Epidermis der „scutate scales“ eine schwache bis mäßig starke Reaktion. Die Hornschicht reagiert in der äußeren Epidermis negativ und in der inneren Epidermis und Scharnierregion stark positiv.

Die Aktivität der *Adenosintriphosphatase* ist im Stratum basale und im basalen Abschnitt des Stratum intermedium bei Mangeltieren und biotinsupplementierten Tieren etwa gleich groß. Die Lederhaut in der Region der „scutate scales“ der gesunden Tiere reagiert jedoch auf den ATPase-Nachweis deutlich stärker positiv als die der Mangeltiere.

Eine Aktivität der *Thiaminpyrophosphatase* in der Haut ist weder bei Mangel- noch bei biotinsupplementierten Tieren nachweisbar.

Beim Aktivitätsnachweis der *sauren Phosphatase* zeigen das Stratum basale und die basalen zwei Drittel des Stratum intermedium der „scutate scales“ eine mäßige bis geringe Enzymaktivität, während bei Mangeltieren keine Enzymaktivität nachzuweisen ist. Die oberen Zellschichten der Epidermis reagieren bei Mangel- und bei biotinsupplementierten Tieren negativ.

4.2 Tabellarische Darstellung der lichtmikroskopischen Ergebnisse

Da die Brust- und Rückenhaut in den durchgeführten histochemischen Nachweisen keine Unterschiede erkennen lässt, werden beide Hautlokalisationen zusammen dargestellt.

4.2.1 Auswertung der PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Die PAS-Reaktion ist ein histochemischer Nachweis für (Muco-) Polysaccharide, Muco- und Glucoproteide sowie von Gluco- u. Phospholipide. Glykogen wurde durch vorherige Inkubation mit Diastase herausgelöst. Lipide sind durch das Fixieren und Einbetten der Proben vorab ebenfalls herausgelöst worden und nehmen nicht mehr an der PAS-Reaktion teil.

Tabelle 6: Auswertungsschlüssel für die Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Reaktionsstärke	Farbreaktion
negativ (-)	farblos
schwach positiv (+/-)	hellrosa
positiv (+)	rosarot

Tabelle 7: Ergebnisse der Perjodsäure-Schiff-Reaktion in der Brust- und Rückenhaut des Haushuhns

Reaktionsort:	intrazellulär		interzellulär	
	B	M	B	M
Basalmembran			+	+
Str. basale	-	-	-	-
Str. intermedium ¹	-	-	-	-
Str. transitivum	-	-	-	-
Str. corneum -jung	-	-	+/-	+/-

¹ Da die befiederte Haut sehr dünn ist, wird das Stratum intermedium nicht weiter unterteilt.

-alt	-	-	+/-	+/-
------	---	---	-----	-----

Tabelle 8: Ergebnisse der Perjodsäure-Schiff-Reaktion in der Haut der „scutate scales“ (innere und äußere Epidermis sowie Scharnierregion)

Reaktionsort:	intrazellulär		interzellulär	
Gruppen:	B	M	B	M
Basalmembran			+	+
Str. basale	+/-	+/-	-	-
Str. intermedium				
-unteres Drittel	+/-	+/-	-	-
-mittleres Drittel	+/-	+/-	-	-
-oberes Drittel	+/-	+/-	-	-
Str. transitivum	viele feinkörnige pos. Granula	nur in einzelnen Zellen geringe Anzahl pos. Granula	-	-
Str. corneum				
-jung	viele feinkörnige pos. Granula	+/-	+/-	+/-
-alt	+/-	+/-	+/-	+/-

Tabelle 9: Ergebnisse der Perjodsäure-Schiff-Reaktion in der Haut der „reticulate scales“ (Mittelfußballen)

Reaktionsort:	intrazellulär		extrazellulär	
Gruppen:	B	M	B	M
Basalmembran			+	+
Str. basale	-	-	-	-
Str. intermedium				
-unteres Drittel	pos. feinkörnige Granula in mäßiger Anzahl	-	-	-
-mittleres Drittel	pos. feinkörnige Granula in mittelmäßiger Anzahl	-	-	-
-oberes Drittel	pos. feinkörnige Granula in großer Anzahl	blasige Strukturen ² +/-	-	+/-, +
Str. transitivum	pos. feinkörnige Granula in großer Anzahl	blasige Strukturen +/-	+/-	+/-
Str. corneum				
-jung	fein-bis grobkörnige Granula + in großer Anzahl	-	+	+/-
-alt	+/-	+/-	+	+/-

² Die blasigen Strukturen sind lichtmikroskopisch nicht eindeutig in ihrer Lage, ob extra- oder intrazellulär, zu bestimmen.

4. 2. 2 Auswertung der SH- und SS-Gruppenachweise

Die Dihydroxy-Dinaphtyl-Disulfid-Reaktion (DDD-Reaktion) nach BARNETT u. SELIGMANN (1952) wurde zum Nachweis der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) eingesetzt. Ein niedriger SH-Gruppen-Gehalt ergibt eine rote Färbung, ein hoher Gehalt eine Blaufärbung des Gewebes

Tabelle 10: Auswertungsschlüssel für den Nachweis der SS- und SH-Gruppen (nach KORTE, 1987)

REAKTIONSIKTENSITÄT:	FÄRBUNG:	GEHALT AN SH-/SS-GRUPPEN
0 = keine Reaktion	farblos	keine SH- bzw. SS-Gruppen
1 = schwach positiv	rosa	
2 = schwach bis mittelgradig positiv	rosarot	
3 = mittelgradig positiv	dunkelrot	
4 = mittelgradig bis stark positiv	rotviolett	
5 = stark positiv	violett	
6 = stark bis sehr stark positiv	blauviolett	
7 = sehr stark positiv	blau	hoher Gehalt an SH- bzw. SS-Gruppen

Tabelle 11: Legende zu den folgenden Tabellen des SH- bzw. SS-Gruppenachweises

<u>DDD</u>	= <u>D</u> ihydroxy- <u>D</u> inaphtyl- <u>D</u> isulfid Reaktion (P SH-Gruppenachweis)
<u>B_M-DDD</u>	= <u>B</u> lock der SH-Gruppen mit N-Äthylm <u>a</u> leinimid + <u>DDD</u>
<u>B_J-DDD</u>	= <u>B</u> lock der SH-Gruppen mit Monojodessigsäure + <u>DDD</u> (P Nachweis reduzierender nicht-SH-Gruppen)
<u>B_M-R-DDD</u>	= <u>B</u> lock der SH-Gruppen mit N-Äthylm <u>a</u> leinimid, <u>R</u> eduktion der SS-Gruppen und <u>DDD</u> -Reaktion
<u>B_J-R-DDD</u>	= <u>B</u> lock der SH-Gruppen mit Monojodessigsäure, <u>R</u> eduktion der SS-Gruppen und <u>DDD</u> -Reaktion (P SS-Gruppenachweis)
<u>R-DDD</u>	= <u>R</u> eduktion der SS-Gruppen und <u>DDD</u> -Reaktion (SS- und SH-Gruppenachweis)

Die Nachweise der SH- und SS-Gruppen ergeben in der Brust- und Rückenhaut identische Ergebnisse und werden daher in einer Tabelle zusammengefaßt. Unterschiede zwischen Biotinmangel- und biotinsupplementierten Tieren treten hierbei nicht auf.

Tabelle 12: Ergebnisse des SH-Gruppen- und SS-Gruppennachweises in der Brust- und Rückenhaut des Haushuhns

Reaktion:	DDD	B _M /B _J - DDD	B _M /B _J - R - DDD	R - DDD
Str. basale	1	0	1	1
Str. intermedium	1	0	1	1
Str. transitivum	1 (5) ³	0	1	1
Str. corneum	5	0	5	5

³ Die Zellgrenzen im oberen Abschnitt des Stratum intermedium und des Stratum transitivum sind sehr intensiv violett gefärbt und treten deutlich hervor.

Tabelle 13: Ergebnisse des SH-Gruppen- und SS-Gruppennachweises in der Haut der „scutate scales“ (anterior am Mittelfuß) beim Haushuhn

Reaktion:	DDD		B_M/B_J-DDD		B_M/B_J-R-DDD		R-DDD	
Gruppen:	B	M	B	M	B	M	B	M
Str. basale	1	1(2) ⁴	0	0	0/1	1	0/1(1)	1(2)
Str. intermedium								
-unteres Drittel	1	1 (2)	0	0	0/1	1	0/1 (1)	1 (2)
-mittleres Drittel	1	1 (2)	0	0	0/1	3 (1)	0/1 (1)	1 (2)
-oberes Drittel	4	4	0	0	4 (1)	3 (2)	4 (2)	4 (4)
Str. transitivum	4/5 (4)	4/5 (4)	0	0	4 (1)	5 (2)	4 (2)	4/5 (4)
Str. corneum								
-jung	5 (4)	5 (4)	0	0	6 (1)	6/7 (2)	5 (2)	5 (4)
-alt	5/6 (4)	5 (4)	0	0	6 (1)	6/7 (2)	6 (2)	5 (4)

⁴ Die in Klammern geschriebenen Werte beziehen sich auf die Scharnierregion und die innere Epidermisoberfläche der "scutate scales", sofern sie sich anders verhalten als die äußere Epidermisoberfläche.

Tabelle 14: Ergebnisse des SH-Gruppen- und SS-Gruppennachweises in der Haut der „reticulate scales“ (Mittelfußballen) beim Haushuhn

Reaktion	DDD		B _M /B _J - DDD		B _M /B _J -R- DDD		R - DDD	
	B	M	B	M	B	M	B	M
Str. basale	4	4	0	0	1	1	1	3/4
Str. intermedium								
-unteres Drittel	4	4	0	0	1/2	1	4	3/4
-mittleres Drittel	4	4	0	0	2	1	4	3/4
-oberes Drittel	4/5	4/5	0	0	2	2	4	4/5
Str. transitivum	5	4/5	0	0	5	5	5	5
Str. corneum								
-jung	6 (5) ⁵	1	0	0	4	5	6(7)	5
-alt	6	1	0	0	5	5	5(6/7)	5

⁵ Die in Klammern stehenden Werte geben die Verhältnisse in der Epidermis zwischen zwei Schuppen wieder. Fehlen diese, so entsprechen sich beide Werte.

4. 2. 3 Auswertung der Sudanschwarz B - Färbung und der Lipiddifferenzierung durch den Nilblausulfat-Nachweis

Beide Fettnachweise wurden in der Haut der „scutate scales“ und der „reticulate scales“ durchgeführt. Sudanschwarz B färbt generell Fette schwarz an. Mit Nilblausulfat werden neutrale Lipide (rot) und saure Lipide (blau) differenziert.

Tabelle 15: Ergebnisse der Sudanschwarz B-Färbung und des Nilblausulfat-Nachweises beider Schuppenhäute bei Biotinmangel- und bei biotinsupplementierten Hühnerküken

Hautstelle:	„scutate scales“ ⁶				„reticulate scales“ ⁷			
Gruppen:	B		M		B		M	
Reaktion:	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>
Str. basale	+++	rot/violett	+++	rot/violett	-/+	blau	+/-	blau
Str. intermedium								
-unteres Drittel	+++	blau	+++	blau	+	blau	+/-	blau
-mittleres Drittel	+	blau	++	blau	++	blau	+/-	blau
-oberes Drittel	+	blau	+/-	blau	++	blau	++	blau
Str. transitivum	+	blau	+/-	blau	+++	blau	++	blau
Str. corneum								
-jung	++	blau	-	blau	++	blau/rosa	+	blau
-alt	-	blau	-	blau	++	blau/rosa	++	blau

S = Sudanschwarz B

N = Nilblausulfat

⁶ Die Scharnierregion und die innere Epidermis der „scutate scales“ weisen bei der Sudanschwarz B-Färbung eine ++ Reaktion und bei dem Nilblausulfat-Nachweis eine einheitliche Blaufärbung durch alle Schichten der Epidermis auf.

⁷ Die blasigen Gebilde in der oberen Epidermis der „reticulate scales“ sind weder mit Sudanschwarz B noch mit Nilblau anfärbbar.

4. 2. 4 Histidinnachweis

Beim Histidinnachweis nach LANDING und HALL (1956) färben sich histidinhaltige Strukturen rotbraun bis blaubraun.

Tabelle 16: Ergebnisse des Histidinnachweises in den „scutate -“ und den „reticulate scales“ bei Biotinmangel- und bei biotinsupplementierten Hühnern (extrazelluläre und intrazelluläre Lage)

Hautstelle:	„scutate scales“				„reticulate scales“			
Gruppen:	B		M		B		M	
Reaktionsort:	<u>ez</u>	<u>iz</u>	<u>ez</u>	<u>iz</u>	<u>ez</u>	<u>iz</u>	<u>Ez</u>	<u>iz</u>
Str. basale	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Str. intermedium -unteres Drittel	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
-mittleres Drittel	+/- (+) ⁸	+/-	+/- (+)	+/-	+/-	-	+/-	-
-oberes Drittel	+/- (+)	+	+/- (+)	+	++	+	+/++	+/- ⁹
							großblasige Strukturen sind teils deutlich rotbraun gefärbt	
Str. transitivum	+/- (+)	+	+/- (+)	+	++	+	+/++	+/-
							großblasige Strukturen sind deutlich rotbraun gefärbt	
Str. corneum jung	- (+)	-, da orange- farben	-(+)	-, da orange- farben	+	+/-	+	+
							kleinblasige Strukturen sind deutlich rotbraun gefärbt	
alt	- (+)	(++/deutlich rotbraun)	- (+)	(++/deutlich rotbraun)	+	+/-	+	+

⁸ Die in Klammern stehenden Werte beziehen sich auf die innere Epidermis und die Epidermis der Scharnierregion

⁹ Im oberen Drittel des Stratum transitivum und im Str. transitivum sind einige Zellen intrazellulär völlig ungefärbt, insbesondere im Bereich der Epidermifurchen (ca 30% helle Zellen).

4. 2. 5 Nachweise der Enzyme Adenosintriphosphatase (ATPase), Thiaminpyrophosphatase (TPPase) und saure Phosphatase (sPase)

Die Körperstellen Brust- und Rückenhaut werden zusammengefaßt, da beide gleiche Ergebnisse aufweisen. Die Adenosintriphosphatase - aktiven Stellen sowie die Thiaminpyrophosphatase - aktiven Stellen sind braun-schwarz und die saure Phosphatase - aktiven Stellen sind rot gefärbt.

Tabelle 17: Aktivität der Adenosintriphosphatase (Enzymnachweis nach ESSNER NOVIKOFF, 1962) in den untersuchten vier Hautstellen von Biotinmangel- und Biotinsupplementierten Hühnern

Hautstellen:	Brust- und Rückenhaut		„scutate scales“		„reticulate scales“	
	B	M	B	M	B	M
Lederhaut	+++	++	++	+	++	+++
Str. basale	+	-	+	+	+	+
Str. intermedium						
-unteres Drittel	-	-	+/-	+/-	+	+/-
-mittleres Drittel	-	-	+/-	-	-	-
-oberes Drittel	-	-	-	-	-	-
Str. transitivum	-	-	-	-	-	-
Str. corneum						
-jung	-	-	-	-	-	-
-alt	-	-	-	-	-	-

Tabelle 18: Aktivität der Thiaminpyrophosphatase (Enzymnachweis nach ESSNER und NOVIKOFF, 1962) in den untersuchten vier Hautstellen von Biotinmangel- und biotinsupplementierten Hühnern

Hautstellen:	Brust- und Rücken- haut		„scutate scales“		„reticulate scales“	
	B	M	B	M	B	M
Lederhaut	-	-	-	-	-	-
Str. basale	-	-	-	-	+ ¹⁰	-
Str. intermedium						
-unteres Drittel	-	-	-	-	+	-
-mittleres Drittel	-	-	-	-	++	-
-oberes Drittel	-	-	-	-	++	-
Str. transitivum	-	-	-	-	++	-
Str. corneum						
-jung	-	-	-	-	-	-
-alt	-	-	-	-	-	-

¹⁰ Die positiven Reaktionen in der Haut der "reticulate scales" von biotinsupplementierten Tieren befinden sich perinukleär in Gestalt punktförmiger schwarzer Niederschläge.

Tabelle 19: Aktivität der sauren Phosphatase (Enzymnachweis nach GOMORI, modifiziert durch BARKA, 1964) in den untersuchten vier Hautstellen von Biotinmangeltieren und biotinsupplementierten Hühnerküken.

Hautstelle:	Brust- und Rückenhaut		„scute scales“		„reticulate scales“	
	B	M	B	M	B	M
Lederhaut ¹¹	++	++	+	+/-	++	++
Str. basale	+/- ocker ¹²	+	+	- hellrotbraun	+/- hellrotbraun	+/-
Str. intermedium -unteres Drittel	- ocker	+/-	+/- rotbraun	- hellrotbraun	- hellrotbraun	+/-
-mittleres Drittel	- ocker	-	+/- rotbraun	- hellrotbraun	- hellrotbraun	+/-
-oberes Drittel	- gelbocker	-	-	- hellrotbraun	- hellrotbraun	+/-
Str. transitivum	- gelbocker	-	- gelbrot	- gelbrot	- orange	- rot
Str. corneum -jung	- / gelb	-	- / hellgelb	- / hellgelb	- / orange-gelb	- / rot
-alt	- gelb	-	- hellgelb	- hellgelb	- hellgelb mit roten	- gelbrot

¹¹ Die Lederhaut reagiert generell stärker als die Epidermis. Leuchtend rote, feinkörnige Niederschläge sind in relativ großer Dichte in den Fibroblasten und den Endothelzellen nachzuweisen.

¹² Die Färbung der verschiedenen Schichten stellt möglicherweise eine spezifische, diffusere Reaktion auf diesen Nachweis dar, da die Kontrollen durchgehend eine hellgelbe Anfärbung zeigen.

					Streifen	
--	--	--	--	--	----------	--