

D Untersuchungsergebnisse

1. Die Ergebnisse der Analyse der Futterbiotingehalte

1.1. Der Hauptversuch

Die Ergebnisse der Analyse der Futterbiotingehalte des Hauptversuchs sind in Tabelle 6a dargestellt. Das Futter der Standardgruppe enthält mit mindestens 300 µg Biotin / kg Futter in jeder Charge einen durchgängig annähernd gleichbleibenden Biotinzusatz, der vor allem in den letzten acht Mastwochen (ab P5) deutlich höher als vorgesehen ist. In der Gruppe der doppelt biotindosierten Tiere liegen die Werte der Futteranalyse annähernd im vorgesehenen Bereich, in den letzten acht Mastwochen (ab P5) leicht darüber. Das Futter der vierfach biotindosierten Gruppe enthält bereits ab P2 (3. Mastwoche) einen geringeren Biotinzusatz als vorgesehen. Diese Abweichung ist ab P4 (10. Mastwoche) erheblich, wodurch in den letzten sieben Mastwochen bezüglich der Fragestellung eines Biotineinflusses auf die Untersuchungsergebnisse zwischen den Fütterungsgruppen keine ausreichende Differenz der Biotinzulagen besteht.

In den weiteren Ausführungen werden die unterschiedlichen Versuchsgruppen trotz der Abweichungen im Biotin Soll- und Ist Wert zur besseren Wiederekennung weiterhin als Standard, doppelt- und vierfach biotindosiert bezeichnet.

Tabellen 6a und b: Analyseergebnisse der Futterbiotingehalte (Angaben in µg / kg Futter)

a. Futter-Biotingehalte – Hauptversuch						
Futtercharge	Standard		doppelt		vierfach	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
P1 (Woche 1 – 2)	220	300	440	470	880	870
P2 (Woche 3 – 5)	220	330	440	460	880	780
P3 (Woche 6 – 9)	220	320	440	460	880	730
P4 (Woche 10 – 13)	220	310	440	390	880	570
P5 (Woche 14 – 17)	150	340	300	400	600	500
P6 (Woche 18 – 21)	150	400	300	360	600	480
b. Futter-Biotingehalte –Wiederholungsversuch						
P1 (Woche 1 – 2)	-*	-*	440	570	nicht angewendet	
P2 (Woche 3 – 5)	-*	-*	440	510		
P3 (Woche 6 – 9)	-*	-*	440	560		
P4 (Woche 10 – 13)	-*	-*	440	450		
P5 (Woche 14 – 17)	-*	-*	300	340		
P6 (Woche 18 – 21)	-*	-*	300	230		

*: nicht analysiert

1.2. Der Wiederholungsversuch

Vom Wiederholungsversuch wird das doppelt biotinsupplementierte Futter geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6b dargestellt. Demnach enthält die Versuchsdät in den ersten neun Wochen einen höheren Biotinzusatz als vorgesehen und in den letzten vier Wochen einen etwas niedrigeren Zusatz.

2. Die Befunde der makroskopischen Untersuchungen

Im Folgenden werden die Befunde der makroskopischen Untersuchungen zunächst beschrieben und verglichen. Durch die darauffolgende statistische Auswertung wird ein Einfluss der einzelnen Fütterungsgruppen bzw. der unterschiedlichen Altersstufen dargestellt.

2.1. Die makroskopische Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere (Befiederungszustand, Verschmutzungsgrad, Zustand der Brusthaut)

Die Tiere des Hauptversuchs werden auf den Allgemeinzustand hin untersucht. Parameter der Bewertungskriterien sind der Befiederungszustand und der Verschmutzungsgrad (jeweils drei Teilnoten) und der Zustand der Brusthaut (sechs Teilnoten).

(siehe Teil C, Kapitel 2)

2.1.1. Die makroskopische Beurteilung des Allgemeinzustands nach 6 Wochen

Es sind insgesamt 120 Tiere im Alter von 6 Wochen beurteilt worden. Das Gefieder ist im Allgemeinen intakt, bei 10 Tieren ist es leicht zerzaust, federlose Bezirke kommen nicht vor, die Schwanzfedern sind in ihrer vollen Länge erhalten. Eine Verschmutzung des Gefieders, vornehmlich im Bereich der Körperunterseite und stellenweise im Rückenbereich, wird bei mehr als der Hälfte der Tiere beobachtet. Der Zustand der Brusthaut ist bei allen untersuchten Tieren einwandfrei.

2.1.2. Die makroskopische Beurteilung des Allgemeinzustands nach 14 Wochen

Es sind insgesamt 120 Tiere im Alter von 14 Wochen beurteilt worden. Bei maximal einem Drittel der Tiere wird der Befiederungszustand beanstandet. Die Schwung- und Schwanzfedern können stark ausgefranst und verkürzt sein, es kommen, wenn überhaupt, sehr kleine federlose Bereiche am Nacken oder am Rücken vor. Der Verschmutzungsgrad wird bei über 90 % der Tiere dieser Altersstufe beanstandet. Im Bereich der Körperunterseite, der Schwanzfedern und Schwungfederspitzen können flächige

Verklebungen auftreten. An der Brust werden bei maximal 21 Tieren vereinzelte oder multiple, frei verschiebliche Verschorfungen gefunden. Knopfartige, nicht frei verschiebliche Verschorfungen kommen bei zwei Tieren vor. Brustblasen sind nicht vorhanden.

2.1.3. Die makroskopische Beurteilung des Allgemeinzustands nach 21 Wochen

Im Alter von 21 Wochen werden insgesamt 420 Tiere beurteilt. Der Befiederungszustand ist - bei geringgradig unterschiedlicher Einschätzung der beiden Beurteilenden - bei der Hälfte der Tiere nicht intakt. Der Zustand der Schwungfedern hat sich im Vergleich zu 14 Wochen etwas verbessert, die Schwanzfedern sind auch bei diesen Tieren häufig ausgefranst, verkürzt oder ausgerissen, federlose Bereiche der Rückenpartie kommen vereinzelt vor. Über zwei Drittel der Tiere werden als nicht sauber beurteilt. Davon sind maximal 17 Tiere großflächig verschmutzt oder zeigen flächige Verklebungen der Federn. An der Brust von einem Drittel der Tiere sind Veränderungen zu erkennen. Nicht frei verschiebliche, knopfartige Verschorfungen kommen bei neun Tieren vor. Brustblasen sind bei sechs der insgesamt 420 untersuchten Tiere vorhanden.

2.2. Die statistische Auswertung der Beurteilung des Allgemeinzustands

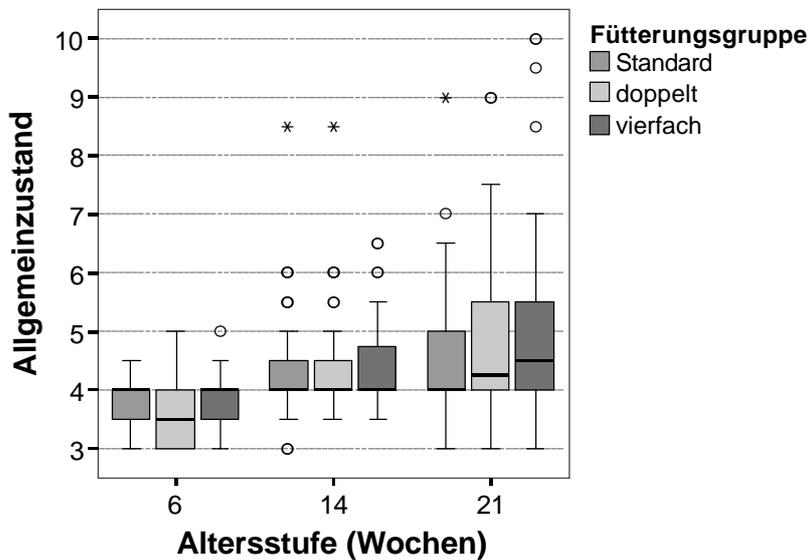
2.2.1. Die Übereinstimmung der beiden Beurteilenden

Durch die Summe der Benotung der Parameter Befiederungszustand, Verschmutzungsgrad und Brusthautzustand wird der Allgemeinzustand als Gesamtnote zwischen 3 und 12 dargestellt. Die Übereinstimmung der Gesamtnoten beider Beurteiler werden für jeden Untersuchungstermin in Anhang 1, Tabellen 1, 2 und 3 dargestellt. Abgesehen von der Beurteilung eines der vierfach biotindosierten Tiere im Alter von 21 Wochen treten Abweichungen um mehr als zwei Bewertungsstufen zu keinem Zeitpunkt auf. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der beiden Untersucher werden die Ergebnisse der Bestimmung des Allgemeinzustands zur weiteren Bearbeitung zu einem Mittelwert zusammengefasst.

2.2.2. Der Vergleich des Allgemeinzustands bezüglich der Fütterungsgruppen

In der Textabbildung 1 ist eine graphische Übersicht der mittleren Bewertungen dargestellt. Im Alter von 6 Wochen zeigen die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe im Mittel den besten Allgemeinzustand. Ab dem Alter von 14 Wochen haben die Tiere der Standardgruppe und doppelt biotindosierten Gruppe im Mittel den besseren Allgemeinzustand, wobei die Tiere der Standardgruppe mit 21 Wochen im Mittel etwas besser beurteilt werden als die der doppelt biotindosierten Gruppe.

Abbildung 1: Darstellung der Bewertung des Allgemeinzustands (Vergleich der Fütterungsgruppen)

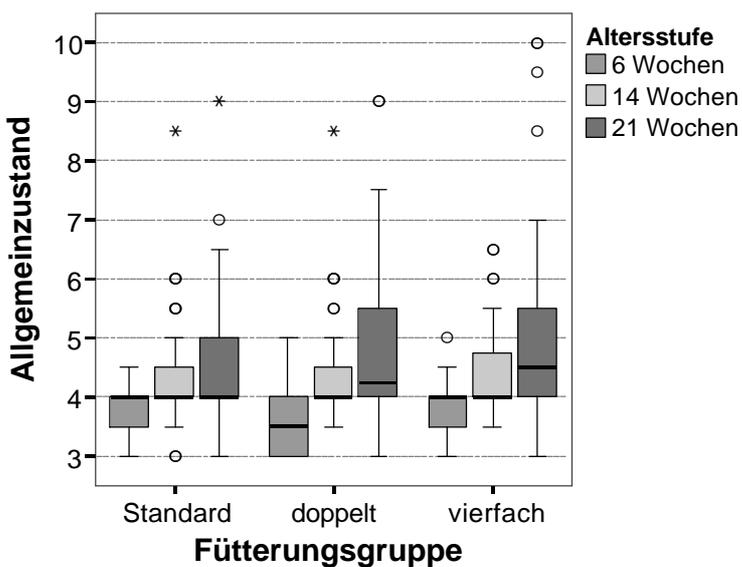


y-Achse: Gesamtnote 3: keine Beanstandung;
Gesamtnote 12: höchste Beanstandung

2.2.3. Der Vergleich des Allgemeinzustands bezüglich der Altersstufen

In der Textabbildung 2 ist eine graphische Übersicht der mittleren Bewertungen dargestellt.

Abbildung 2: Darstellung der Bewertung des Allgemeinzustands (Vergleich der Altersstufen)



y-Achse: Gesamtnote 3: keine Beanstandung;
Gesamtnote 12: höchste Beanstandung

Der Allgemeinzustand der Tiere jeder Fütterungsgruppe wird nach 6 Wochen im Mittel am besten beurteilt. Mit fortschreitendem Alter kommt es in jeder Gruppe im Mittel zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustands.

2.2.4. Der statistische Vergleich der Beurteilungen bezüglich der Fütterungsgruppen

Hinsichtlich der unterschiedlichen Biotindosierungen kommt es bei einem Signifikanzniveau von 0,05 lediglich bei den Tieren im Alter von 6 Wochen zu signifikanten Unterschieden ($p=0,016$) bei der Beurteilung des Allgemeinzustands. Im paarweisen Vergleich der Fütterungsgruppen ist der Unterschied auf Basis des korrigierten Signifikanzniveaus von 0,017 zwischen der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe statistisch signifikant ($p=0,006$).

2.2.5. Der statistische Vergleich der Beurteilungen bezüglich der Altersstufen

Bezüglich des Tieralters kommt es in jeder Fütterungsgruppe zu einem signifikanten Unterschied bei der Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere (Tab. 7). Im paarweisen Vergleich der Altersstufen ist der Unterschied zwischen den Altersstufen 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen statistisch signifikant, nicht jedoch zwischen den Altersstufen 14 und 21 Wochen (Tab. 7).

Tabelle 7: Übersicht der p-Werte für den Allgemeinzustand (Vergleich der Altersstufen)

Altersstufenvergleich	p-Wert		
	Standard (<0,0001 ¹)	Doppelt (<0,0001 ¹)	Vierfach (<0,0001 ¹)
6 Wo. zu 14 Wo.	0,002 ²	<0,0001 ²	<0,0001 ²
6 Wo. zu 21 Wo.	<0,0001 ²	<0,0001 ²	<0,0001 ²
14 Wo. zu 21 Wo.	n. s. ³	n. s. ³	n. s. ³

¹ Signifikanzniveau: 0,05

² Signifikanzniveau: 0,017

³ nicht signifikant (Signifikanzniveau: 0,017)

2.3. Die makroskopische Beurteilung der Fußballen

Die makroskopische Beurteilung der Fußballen wird sowohl an den Tieren des Hauptversuchs als auch an den 21 Wochen alten Tieren des Wiederholungsversuchs durchgeführt. Bei den untersuchten Tieren können je nach Lokalisation die verschiedenen Schuppentypen der unbefiederten Haut des Laufs bereits nach 6 Wochen deutlich unterschieden werden. Die reticulate scales des Metatarsal- und Digitalballens besitzen die typische noppenartige Struktur. Der Metatarsalballen ist durch das ihn unterlagernde subkutane Fettpolster mit einem Hügel oder Plateau vergleichbar. An den „Hängen“ dieses

Hügels besitzen die reticulate scales eine geringere basale Ausdehnung, sind also kleiner als auf dem „Plateau“ (Abb. 1a). Daher befinden sich im Zentrum des Metatarsalballens ca. 5 bis 6 Schuppen pro cm², am Rand dagegen mehr als 20 / cm².

Im Folgenden werden die makroskopisch sichtbaren Veränderungen für jede untersuchte Altersstufe beschrieben.

2.3.1. Die makroskopische Beurteilung der Fußballen nach 6 Wochen

Es werden insgesamt 120 Tiere im Alter von 6 Wochen untersucht. Bei 16 % der Tiere treten keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen der reticulate scales auf. Die gesamte Fläche des Metatarsalballens kann von Veränderungen betroffen sein, die genaue Lokalisation vorhandener Veränderungen ist individuell unterschiedlich. Bei allen Tieren sind die Fußpaare gleichermaßen betroffen. Mitunter ist die Fußungsfläche stellenweise mit Resten von Einstreu verklebt. Es treten rötlichbraune Einfärbungen einzelner Schuppen oder Schuppenbereiche auf. Vor allem in diesen Bezirken erscheint die Haut krustig, ausgetrocknet und rissig. Durch Manipulation können Blutungen ausgelöst werden. Verschorfungen sind bei zwei Tieren der Standardgruppe zu beobachten. Bei maximal 12,5 % der Tiere wird eine Verlängerung der meist zentral am Metatarsalballen gelegenen Schuppen beobachtet, die zur suprapapillären Oberfläche hin spitz zulaufen und dabei abflachen. Bei starker Verlängerung knicken sie um und lagern sich schieferplattenartig übereinander. Insgesamt zeigen 24 Tiere (20 %) Veränderungen an den Digitalballen, vornehmlich der dritten und vierten Zehe (Digiti III et IV), wobei am häufigsten der erste und der letzte Digitalballen einer Zehe betroffen sind. Die Zwischenräume der Digitalballen (Areae interpulvinares) und die erste Zehe (Hallux) sind bei keinem der untersuchten Tiere von Veränderungen betroffen.

2.3.2. Die makroskopische Beurteilung der Fußballen nach 14 Wochen

Im Alter von 14 Wochen zeigen alle der 120 beurteilten Tiere Veränderungen der gleichermaßen betroffenen Fußballen. Eine großflächige Verschmutzung der Fußungsfläche mit Einstreu- und Kotresten ist die Regel. An den Metatarsalballen aller Tiere sind rötlichbraune Einfärbung einzelner Schuppenbezirke von unterschiedlicher Ausdehnung zu erkennen. Hautrisse und die Bildung von Verschorfungen sind bei mehr als 80 % der Tiere sichtbar. Die Ausdehnung der Verschorfungen ist individuell unterschiedlich. Es entstehen halbmondförmige Verschorfungen entweder am proximalen Teil oder an der medialen und / oder lateralen Seite des Metatarsalballens. Durch die Formation eines meist sehr dünnen, unveränderten Randwulstes kann es zu einer Art Demarkation dieser Verschorfungen kommen. Andererseits finden sich diffus auf dem Metatarsalballen verteilte,

punktförmige Verschorfungsbereiche. Mit Ausnahme von insgesamt 24 Tieren besteht bei allen eine Verlängerung, Zuspitzung und schieferplattenartige Übereinanderlagerung der Schuppen der Metatarsalballen. Fast die Hälfte der Tiere zeigt Veränderungen der Digitalballen. Die erste Zehe (Hallux) ist seltener betroffen. Innerhalb der Standardgruppe ist diese bei weniger als einem Drittel der Tiere betroffen. Das häufigste Erscheinungsbild der Veränderungen am Digitalballen sind diffus verteilte, punktförmige Verschorfungen und eine Verlängerung, Zuspitzung und Übereinanderlagerung der Schuppen. Dies ist teilweise besonders deutlich an dem ersten Ballen der zweiten Zehe und dem zweiten Ballen der dritten Zehe ausgeprägt und kann mit einer Schwellung des entsprechenden Ballens verbunden sein. In dieser Altersstufe sind die Veränderungen nicht auf die Ballen beschränkt, sondern greifen auch auf die Zwischenräume über.

2.3.3. Die makroskopische Beurteilung der Fußballen nach 21 Wochen

Nach 21 Wochen zeigen sechs der insgesamt 147 beurteilten Tiere keine makroskopischen Veränderungen der Schuppenhäute (Abb. 1a). Zu diesem Zeitpunkt sind die Fußpaare nicht immer gleichermaßen betroffen, extreme Abweichungen um mehr als zwei Bewertungsstufen kommen aber kaum vor (siehe Kapitel 2.4.1.). Bei über 90 % der Tiere werden im Bereich der Metatarsalballen Schorfkrusten unterschiedlicher Ausdehnung beobachtet. Meist kommen randständig, seltener diffus verteilt, punktförmige Verschorfungen vor (Abb. 1b). Großflächige Schorfkrusten sind ebenfalls zu beobachten. Bei Letzteren kann teilweise die bei den Tieren im Alter von 14 Wochen bereits beobachtete halbmondförmige Gestalt erahnt werden. Eine flächenhafte Abdeckung eines oder beider Metatarsalballens mit einer dicken Schorfkruste ist bei insgesamt 12 Tieren vorhanden (Abb. 1c). Eine Verlängerung und Zuspitzung einzelner Schuppen der Metatarsalballen ist bei 33 Tieren zu erkennen. Es ist auffällig, dass nur noch ca. 17 % der Tiere Veränderungen der Digitalballen aufweisen (Abb. 1b). Am häufigsten wird die Verlängerung und Zuspitzung der Schuppen, vor allem an dem ersten Ballen der zweiten Zehe (Digitus II) beobachtet. Vereinzelt weisen die Digitalballen, unabhängig von der Zehe, kleinere Bezirke mit punktförmigen Verschorfungen auf.

Bei fast zwei Dritteln der Tiere dieser Altersstufe ist erstmalig die normalerweise noppenartige Schuppenhaut des Metatarsalballens zum Teil durch eine glatte Oberfläche ersetzt, die als Narbengewebe angesehen wird (siehe Teil E, Kapitel 5.2. und Abb. 1d). Dieses Phänomen ist meist im Zentrum von ansonsten unverändert erscheinenden Ballen lokalisiert oder wird in Verbindung mit großen Schorfkrusten beobachtet. Dabei entstehen solche Hautbezirke entweder an beliebiger äußerer Grenze der Schorfkruste oder in Form eines „zentralen Auges“. In der Standardgruppe werden bei 57 %, in der doppelt biotindosierten

Gruppe bei 61,2 % und in der vierfach biotindosierten Gruppe bei 67,1 % der Tiere Narben beobachtet.

2.3.4. Die makroskopische Beurteilung der Fußballen der 21 Wochen alten Tiere des Wiederholungsversuchs

Die Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit der Tiere des Wiederholungsversuchs wird nach Beendigung des Mastdurchlaufs im Alter von 21 Wochen bei insgesamt 40 Tieren durchgeführt. Mit Ausnahme von einem Tier der Standardgruppe sind die Fußpaare gleichermaßen betroffen. Vereinzelt, punktförmige Verschorfungen oder annähernd halbmondförmige Verschorfungen am Rand des Metatarsalballens sind bei allen außer fünf Tieren zu finden, sehr selten ist das Zentrum des Ballens betroffen. Im Zentrum des Metatarsalballens zeigen alle Tiere eine Verlängerung der reticulate scales. Bei 10 Tieren sind randständig oder zentral glatte Hautbezirke unterschiedlichen Umfangs zu erkennen. Der erste Ballen der zweiten und seltener auch der dritten Zehe (Digiti II et III) kann bei neun Tieren eine zum Teil beträchtliche Verlängerung der Schuppen, selten auch Schorfbildung zeigen. Bei allen Tieren erscheint die erste Zehe (Hallux) unverändert.

2.4. Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Fußballenbeurteilung

2.4.1. Die Übereinstimmung der Benotung der Fußballen links - rechts

Bei beiden Beurteilenden kommt es in der Benotung der Fußballenpaare desselben Tieres zu Abweichungen. In den Benotungen der beiden Beurteiler zusammengenommen wird eine Abweichung von zwei Bewertungsstufen in der Standardgruppe in 86,1 %, in der doppelt biotindosierten Gruppe in 91,85 % und in der vierfach biotindosierten Gruppe in 91,1 % der Beurteilungen nicht überschritten. Im Wiederholungsversuch kommt es bei einem Tier der Standardgruppe zu einer um eine Bewertungsstufe abweichende Beurteilung der beiden Fußballen.

Aufgrund dieser Ergebnisse werden unterschiedliche Befunde eines Fußpaares bei der Auswertung der Fußballenbeschaffenheit vernachlässigt und die Bewertungen ggf. zu einem Mittelwert zusammengefasst.

2.4.2. Die Übereinstimmung der beiden Beurteilenden

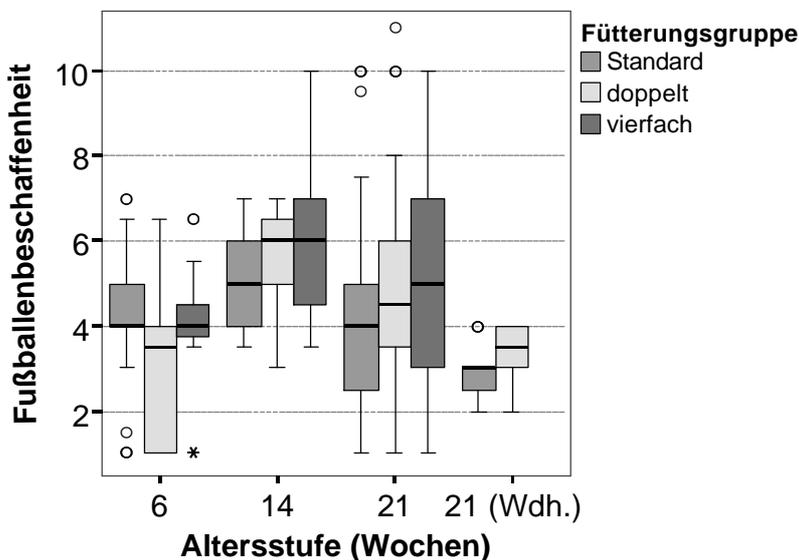
Die tabellarischen Übersichten der Ergebnisse der Übereinstimmung beider Beurteiler sind in den Tabellen 4, 5 und 6 des Anhangs 1 für jeden Untersuchungstermin dargestellt. Eine Abweichung der beiden Beurteilenden um zwei Bewertungsstufen wird bei mindestens 94,8 % der untersuchten 6 Wochen alten Tiere, bei mindestens 97,5 % der 14 Wochen alten Tiere und mindestens 95,8 % der 21 Wochen alten Tiere nicht überschritten. Aufgrund der

hohen Übereinstimmung der beiden Untersucher werden die Ergebnisse der Beurteilungen der Fußballenbeschaffenheit zur weiteren Bearbeitung zu einem Mittelwert zusammengefasst.

2.4.3. Der Vergleich der Fußballenbeurteilung bezüglich der Fütterungsgruppen

In der Textabbildung 3 ist eine graphische Übersicht der mittleren Beurteilungen der Fußballenbeschaffenheit dargestellt. Nach 6 Wochen zeigen die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe im Mittel die beste Fußballenbeschaffenheit, gefolgt von den vierfach biotindosierten Tieren. Ab dem Alter von 14 Wochen haben die Tiere der Standardgruppe im Mittel die beste Fußballenbeschaffenheit, und die doppelt biotindosierten Tiere wurden besser beurteilt als die vierfach biotindosierten Tiere. Eine große Variabilität in der Beurteilung der Fußballen tritt bei den doppelt biotindosierten Tieren im Alter von 6 Wochen auf und bei den vierfach biotindosierten Tieren nach 21 Wochen. Im Wiederholungsversuch zeigen die Tiere der Standardgruppe im Mittel die bessere Fußballenbeschaffenheit. Im Vergleich zu den gleichaltrigen Tieren des Hauptversuchs werden in beiden Fütterungsgruppen die Fußballen besser beurteilt.

Abbildung 3: Darstellung der Bewertung der Fußballenbeschaffenheit (Vergleich der Fütterungsgruppen)

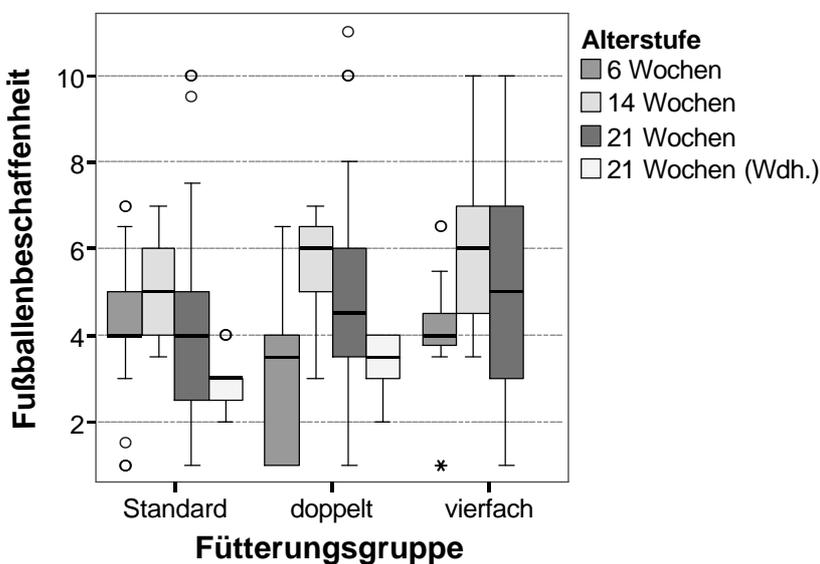


y-Achse: Gesamtnote 1: keine Beanstandung;
 Gesamtnote 11: höchste Beanstandung

2.4.4. Der Vergleich der Fußballenbeurteilung bezüglich der Altersstufen

Eine Übersicht der mittleren Bewertungen der Fußballenbeschaffenheit ist in der Textabbildung 4 dargestellt. In allen Gruppen kommt es beim Übergang von der 6. zur 14. Lebenswochen im Mittel zu einer Verschlechterung der Fußballenbeschaffenheit. Zwischen der 14. und 21. Woche tritt eine Verbesserung ein. In allen Fütterungsgruppen bleibt die Beurteilung der Fußballen im Alter von 21 Wochen im Mittel jedoch schlechter als nach 6 Wochen. Im Vergleich zu den gleichaltrigen Tieren des Hauptversuchs ist die Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit der Tiere des Wiederholungsversuchs in beiden Fütterungsgruppen im Mittel besser.

Abbildung 4: Darstellung der Bewertung der Fußballenbeschaffenheit (Vergleich der Altersstufen)



y-Achse: Gesamtnote 1: keine Beanstandung;
Gesamtnote 11: höchste Beanstandung

2.4.5. Der statistische Vergleich der Fußballenbeurteilung bezüglich der Fütterungsgruppen

Im Hauptversuch kann bezüglich der unterschiedlichen Biotindosierungen ausschließlich bei den Tieren im Alter von 6 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit nachgewiesen werden (Tab. 8).

Im Mehrfachvergleich zeigt sich dabei zwischen der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe und zwischen der doppelt und vierfach biotindosierten ein statistisch signifikanter Unterschied. Im Wiederholungsversuch besteht zwischen den Tieren der beiden

Fütterungsgruppen ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied in der Beurteilung der Fußballen (Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht der p-Werte für die Fußballenbeschaffenheit (Vergleich der Fütterungsgruppen)

Fütterungsgruppen	p - Werte		
	6 Wochen (<0,0001 ¹)	14 Wochen (n. s. ³)	21 Wochen (Wdh.)
Standard zu doppelt	<0,0001 ²	n. s. ³	0,009 ¹
Standard zu vierfach	n. s. ³	n. s. ³	- ⁴
doppelt zu vierfach	0,001 ²	n. s. ³	- ⁴

¹ Signifikanzniveau: 0,05

² Signifikanzniveau: 0,017

³ n. s.: nicht signifikant (Signifikanzniveau: 0,017)

⁴ im Wiederholungsversuch entfiel die vierfach biotindosierte Gruppe

2.4.6. Der statistische Vergleich der Fußballenbeurteilung bezüglich der Altersstufen

Bezüglich der Altersstufen besteht in allen Fütterungsgruppen ein signifikanter Unterschied bei der Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit (Tab. 9). Mit Ausnahme der Standardgruppe wird im paarweisen Vergleich zwischen 6 und 14 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen festgestellt. In der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe besteht außerdem zwischen 14 und 21 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied. Nur in der doppelt biotindosierten Gruppe ist zwischen 6 und 21 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit festzustellen.

Im Vergleich zu den gleichaltrigen Tieren des Hauptversuchs besteht in beiden Fütterungsgruppen der Tiere des Wiederholungsversuchs ein statistisch signifikanter Unterschied in der Beurteilung der Fußballenbeschaffenheit (Tab. 9).

Tabelle 9: Übersicht der p-Werte für die Fußballenbeschaffenheit (Vergleich der Altersstufen)

Altersstufen	p-Wert		
	Standard (0,011 ¹)	doppelt (<0,0001 ¹)	vierfach (<0,0001 ¹)
6 Wo. zu 14 Wo.	n. s. ³	<0,0001 ²	<0,0001 ²
6 Wo. zu 21 Wo.	n. s. ³	<0,0001 ²	n. s. ³
14 Wo. zu 21 Wo.	0,006 ²	0,008 ²	n. s. ³
	Standard	doppelt	- ⁴
21 Wo zu 21 Wo (Wdh.)	0,013 ¹	0,007 ¹	- ⁴

¹ Signifikanzniveau: 0,05

² korrigiertes Signifikanzniveau: 0,017

³ nicht signifikant (Signifikanzniveau: 0,017)

⁴ im Wiederholungsversuch entfiel die vierfach biotindosierte Gruppe

2.5. Die Entwicklung der Körpergewichte

In den Textabbildungen 5 bis 8 sind die während der makroskopischen Beurteilung gemessenen Körpergewichte der untersuchten Tiere jeder Fütterungsgruppe graphisch dargestellt.

Im Alter von 6 Wochen haben die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe im Mittel das höchste Körpergewicht, gefolgt von der Standardgruppe und der vierfach biotindosierten Gruppe. In Letzterer sind Gewichtsschwankungen zwischen den Tieren am geringsten ausgeprägt.

Abbildung 5:
Darstellung der Körpergewichte nach 6 Wochen

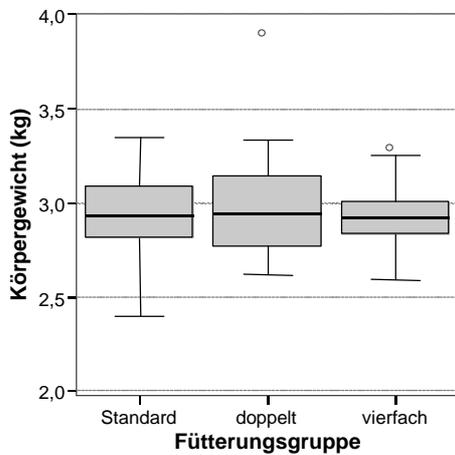


Abbildung 6:
Darstellung der Körpergewichte nach 14 Wochen

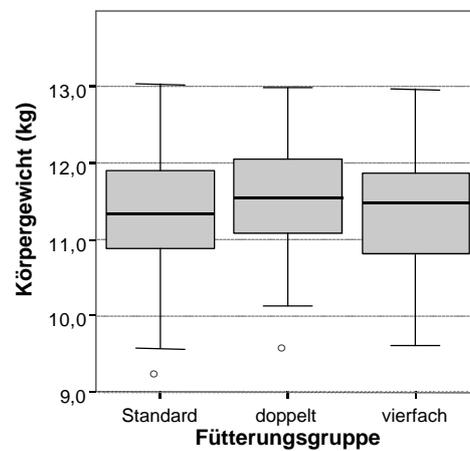


Abbildung 7:
Darstellung der Körpergewichte nach 21 Wochen

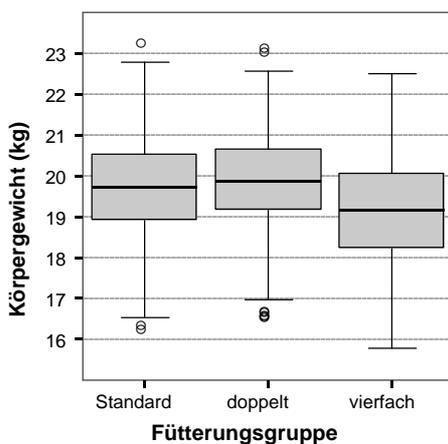
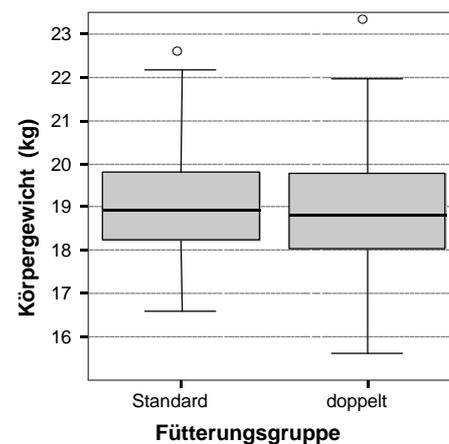


Abbildung 8:
Darstellung der Körpergewichte nach 21 Wochen (Wdh.)



Im Alter von 14 Wochen hat sich das Körpergewicht im Vergleich zu 6 Wochen bei allen Tieren mehr als verdreifacht. Die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe sind im Mittel etwas schwerer als die der übrigen Fütterungsgruppen.

Nach 21 Wochen hat sich das Körpergewicht der Tiere im Vergleich zu 14 Wochen nahezu verdoppelt. Die Tiere der vierfach biotindosierten Gruppe sind zu diesem Zeitpunkt im Mittel am leichtesten und die Tiere der doppelt biotindosierten Gruppe schwerer als die Tiere der Standardgruppe.

Beim Wiederholungsversuch sind die Tiere der Standardgruppe nach 21 Wochen im Mittel schwerer als die Tiere mit doppelter Biotindosierung. Im Vergleich zu den gleichaltrigen Tieren des Hauptversuchs sind die Tiere des Wiederholungsversuchs im Mittel leichter.

2.5.1. Die statistische Auswertung der Entwicklung der Körpergewichte

Im Alter von 6 und 14 Wochen und bei den 21 Wochen alten Tieren des Wiederholungsversuchs bestehen bezüglich des Körpergewichts der Tiere zwischen den Fütterungsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Hauptversuch tritt bei den 21 Wochen alten Tieren zwischen den Fütterungsgruppen bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ein statistisch signifikanter Unterschied der Körpergewichte auf ($p < 0,0001$). Bei dem paarweisen Vergleich der Körpergewichte unterscheiden sich die vierfach biotindosierten Tiere auf der Basis eines korrigierten Signifikanzniveaus von 0,017 statistisch signifikant von den Tieren der übrigen Fütterungsgruppen ($p < 0,0001$).

Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 besteht zwischen den gleichaltrigen Tieren des Haupt- und Wiederholungsversuchs bezüglich der Körpergewichte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$).

2.6. Während der Mast durchgeführte medikamentöse Therapien

Zusätzlich zu der üblichen Impfprophylaxe wurden folgende krankheitsbedingte Behandlungen notwendig: Im Alter von 10 Wochen traten bei den Tieren respiratorische Symptome auf (Schnupfen), der mit einer Tetracyclin-Behandlung entgegengewirkt wurde. Mit 14 Wochen wurde eine Clostridien-Infektion nachgewiesen und eine Behandlung mit Aviapen[®] (Penicillin) eingeleitet. Eine Woche später kam eine Coli-Infektion hinzu, so dass der Einsatz von Ursocyclin[®] (Tetracyclin) notwendig wurde. Die Verabreichung von Aviapen[®] wurde in der 18. Lebenswoche wiederholt.

3. Die Befunde der lichtmikroskopischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen werden anhand der einzelnen Nachweismethoden beschrieben, wobei zwei unterschiedliche Ziele verfolgt werden. Zunächst erfolgt eine ausführliche Beschreibung der generellen morphologischen Befunde. Im sich anschließenden Vergleich der Fütterungsgruppen werden die Häufigkeit und Ausprägung der beschriebenen Befunde wenn möglich zusammengefasst, um einen

eventuellen Einfluss der Fütterungsgruppen oder des Tieralters auf die Hautbeschaffenheit darzustellen.

3.1. Die H.E.-Übersichtsfärbung

3.1.1. Allgemeiner histomorphologischer Aufbau der Haut der reticulate scales

Die Haut der reticulate scales der Metatarsal- und Digitalballen ist deutlich in Unterhaut (Subcutis), Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis) aufgeteilt (Abb. 2a). Die Dermis bildet die gefäßführende Schicht der Haut und ist durch ihren hohen Gehalt an kollagenen Fasern gekennzeichnet. Die Blutgefäße werden bis direkt unter die Basalmembran an die Epidermis herangeführt ohne sie zu durchbrechen. Der oberflächliche Anteil der Lederhaut beteiligt sich an der Bildung des stark ausgeprägten Papillarkörpers. Dessen Primärpapillen sind formgebend für die an der Hautoberfläche als reticulate scales erkennbaren Schuppen. Die Ausdehnung der Primärpapillen in Höhe und Breite ist annähernd gleich. Es ziehen kleinere, flache Sekundärpapillen in Richtung Hautoberfläche. Oberhalb der Sekundärpapillen ist der Anteil der lebenden Epidermis dünner als in den Bereichen, die von der Basis der Sekundärpapillen ausgehen. Zwischen den Primärpapillen bzw. reticulate scales sind die interpapillären Furchen zu erkennen. Dermis und Epidermis werden durch die Basalmembran getrennt.

Die Epidermis, als verhornendes, mehrschichtiges Plattenepithel, besteht aus Sebokeratinozyten, die sich zu Sebokorneozyten differenzieren. Die basophilen, hochprismatischen, mitotisch aktiven Zellen des einschichtigen Stratum basale liegen der Basalmembran direkt auf. Ihre stark basophilen Zellkerne füllen das Zellinnere fast vollständig aus. Das zur Hautoberfläche hin folgende mehrschichtige Stratum intermedium wird von ca. sechs bis 10 Lagen der polygonalen Intermediärzellen gebildet, die in Richtung der Hautoberfläche kontinuierlich abflachen. Diese Schicht wird im Folgenden zur besseren Beschreibung der Befunde in ein unteres, ein mittleres und ein oberes Drittel aufgeteilt. Im Überblick erscheint das Stratum intermedium schwach basophil, wobei eine schattenhafte Azidophilie auch zu erkennen ist, die zur Hautoberfläche hin etwas zunimmt. Insgesamt bleibt die Azidophilie der Intermediärzellen schwach. Zwischen den Intermediärzellen sind deutlich zahlreiche brückenartige Zellkontakte vorhanden. Die stets basophilen, hochovalen bis runden Zellkerne besitzen ein bis zwei sehr prominente Nucleoli und füllen das Zellinnere zu etwa einem Drittel aus. Ein Stratum granulosum, mit den typischen basophil anfärbbaren Keratohyalin granula, kann in der Haut der Metatarsal- und Digitalballen lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Eine eindeutige Bestimmung des sich anschließenden Transitivbereiches, dem Übergangsschicht zwischen der lebenden und toten Epidermis, ist lichtmikroskopisch sehr schwierig. Dieser Bereich stellt sich vielmehr als ein dünner, sich

über mehrere Zellschichten erstreckender, azidophiler Saum zwischen den stark azidophilen Hornzellen und den azidobasophilen Intermediärzellen dar. Die Zellkerne erscheinen in diesem Bereich lichtmikroskopisch stark kondensiert. Der oberflächlichste, tote Anteil der Epidermis wird durch die verhornten Sebokorneozyten des vielschichtigen Stratum corneum gebildet. Diese homogenen, stark azidophilen und abgeflachten Zellen sind je nach Gesichtsfeld kompakt oder locker gepackt. In manchen Bereichen des Stratum corneum ist der Zellinhalt herausgelöst, so dass es dort zu einer netzartigen Auffaserung aus deutlich miteinander verbundenen azidophil angefärbten Zellgrenzen kommt. Zellkerne sind nicht mehr zu erkennen. An der Hautoberfläche kommt es zur Auffransung und Abschilferung der oberflächlichsten Anteile der Hornschicht.

3.1.2. Die Befunde der H.E.-Übersichtsfärbung - Vergleich der Fütterungsgruppen pro Altersstufe

In Anhang 3 Tabelle 1 ist ein vergleichender Überblick der unterschiedlichen Beobachtungen tabellarisch dargestellt.

3.1.2.1. Die Befunde der H.E.-Übersichtsfärbung nach 6 Wochen

Eine beobachtete Abweichung vom geschilderten allgemeinen Aufbau der Haut ist eine Verlängerung der Primärpapillen mit damit verbundener Vertiefung der interpapillären Furchen (Abb. 2a und c). Flache Papillen sind nahezu quadratisch und haben eine Höhen- und Breitenausdehnung zwischen 300 und 400 µm. Verlängerte Papillen erreichen bei einer Breite von 300 µm eine Höhe von bis zu 600 µm. Es gilt generell, dass sich die Basis der Papillen mit zunehmender Höhe verschmälert (Abb. 2c). Durch den Vergleich der Proben der verschiedenen Fütterungsgruppen gleichaltriger Tiere ist festzustellen, dass eine deutliche Verlängerung der Primärpapillen in den Proben der vierfach biotindosierten Tiere am stärksten ausgeprägt ist, am schwächsten in denen der doppelt biotindosierten Tiere. Ein verstärktes warzenförmiges Wachstum der Sekundärpapillen (Abb. 2a) kann in allen Fütterungsgruppen beobachtet werden und ist in der Standardgruppe besonders stark ausgeprägt. Die Sekundärpapillen reichen unterschiedlich tief in die Epidermis hinein, wodurch die lebenden Epidermisanteile oberhalb der verlängerten Sekundärpapillen um bis zu 10 Zellschichten bzw. 100 µm flacher ist als in den Bereichen, die von der Basis der Sekundärpapillen ausgehen. Die Wahrnehmung doppelter Nucleoli im unteren und mittleren Drittel des Stratum intermedium ist generell selten, aber am häufigsten bei den untersuchten Proben der Standardgruppe zu beobachten, gefolgt von denen der vierfach biotindosierten Tiere. Ein Zusammenhang mit der Verdickung der Epidermis ist nicht ersichtlich. Vor allem in den unteren zwei Dritteln des Stratum intermedium, seltener auch im oberen Drittel, sind die

Zellkerne unterschiedlich eingeschnürt, wodurch in einzelnen Zellen perinukleäre Freiräume entstehen. Diese Beobachtung ist bei fast allen untersuchten Proben der Standardgruppe zu finden und in den Proben der übrigen Fütterungsgruppen selten, wobei sie in der vierfach biotindosierten Gruppe etwas häufiger vorkommt als in den Proben der doppelt biotindosierten Tiere. Bei ca. einem Drittel der Proben ist eine Verdickung der Haut zu erkennen, von der die Strata germinativum und corneum gleichermaßen betroffen sind (Abb. 2a). Der Anteil der lebenden Epidermis umfasst im Allgemeinen sechs bis 10 Zelllagen (je nach Länge der Sekundärpapillen) und kann sich auf 15 bis 20 Zelllagen verdicken. Die Höhe des Stratum corneum beträgt mindestens 80 µm und kann auf bis zu 200 µm zunehmen. Die Verdickung der Epidermis wird nicht von einer erhöhten Mitoseaktivität der Basalzellen begleitet. Durch den Vergleich der Proben der verschiedenen Fütterungsgruppen gleichaltriger Tiere ist festzustellen, dass die Ballenhaut der vierfach biotindosierten Tiere dünner ist als die der Tiere der anderen zwei Fütterungsgruppen. Dem Stratum corneum sind bei 16 der untersuchten Tiere oberflächlich exsudative Plaques aus unbestimmbaren azidobasophil angefärbten Zellresten aufgelagert. Unterhalb dieser Auflagerungen ist die Hornschicht strukturell noch zu erkennen, wenngleich sie stark aufgelockert, weniger intensiv oder gar nicht azidophil gefärbt ist und unscharf erscheinende Zellgrenzen aufweist (Abb. 2c). Solche Plaques sind in den Proben der vierfach biotindosierten Tiere häufiger und ausgeprägter vorhanden als in denen der doppelt biotindosierten Tiere, gefolgt von der Standardgruppe. Bei jeweils einer der untersuchten Proben der Standard- und vierfach biotindosierten Tiere kommen oberflächliche Läsionen vor, bei denen das Stratum corneum nekrotisiert und durch eine Ansammlung von Exsudat und Zelldetritus ersetzt ist. Brechen diese Läsionen in tiefere Epidermisschichten ein, so sind sie als Ulzera zu deuten (Abb. 3a und b, Abb. 5a). Bei zwei Proben der Standardgruppe und jeweils drei Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Gruppe reichen vorhandene Ulzerationen in das Stratum intermedium ein. Bei einer weiteren Probe der Standardgruppe und jeweils zwei Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Gruppe durchbricht der Ulkus die Epidermis, die vollständig zerstört erscheint, und reicht bis tief in die Dermis hinein. In der Nachbarschaft vorhandener Ulzera kommt es zu einer Erweiterung der Interzellularräume und zur Ausbildung eines intrazellulären Ödems. Zusätzlich ist ein verstärktes Wachstum von Sekundärpapillen und eine Abflachung der Primärpapillen zu beobachten. Das Erscheinen von Läsionen und Ulzerationen wird stets durch eine Anhäufung von pseudoeosinophilen Granulozyten mit azidophil angefärbten Granula und basophilen Lymphozyten im betroffenen und benachbarten Gewebe begleitet (Abb. 3a). Zum Teil ist auch eine Proliferation von Lymphknötchen in der angrenzenden Dermis zu beobachten. Es kommen allerdings von jeder Gruppe auch unveränderte Proben zur Untersuchung.

3.1.2.2. Die Befunde der H.E.-Übersichtsfärbung nach 14 Wochen

Im Alter von 14 Wochen kommt es insgesamt zu einem gehäuften Auftreten von Läsionen und Ulzera. Durch die damit einhergehende großräumige Zerstörung der Epidermis enthalten eine Vielzahl der untersuchten Proben keine unveränderten Epidermisanteile. Daher wird im Folgenden auf einen Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Veränderungen verzichtet.

Eine Verlängerung der Primärpapillen ist in dieser Altersstufe die Regel. Die Papillen können eine Höhe von 850 µm und eine Breite von 650 µm erreichen. Die Sekundärpapillen werden durch ihr verstärktes Wachstum lang und dünn und ziehen weit in die Epidermis hinein. Der Höhenunterschied der lebenden Epidermisanteile oberhalb und zwischen den verlängerten Sekundärpapillen beträgt, wie bereits nach 6 Wochen zu beobachten war, bis zu 10 Zelllagen bzw. 100 µm. Nach 14 Wochen ist bei der Hälfte der untersuchten Proben erstmalig, unabhängig von der Fütterungsgruppe, ein Ausfüllen der interpapillären Furchen mit Hornzellen zu beobachten. Das Auftreten doppelter Nucleoli ist in den Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere sehr zufällig und in den Proben der Standardgruppe gar nicht zu beobachten. Ein perinukleärer Freiraum kommt im Vergleich zu den 6 Wochen alten Tieren seltener vor und ist am häufigsten in den Proben der Standardgruppe zu finden und in den Proben der doppelt biotindosierten Tiere häufiger als in denen der vierfach biotindosierten Tiere. Mit Ausnahme von drei untersuchten Proben der vierfach biotindosierten Tiere ist das Stratum corneum in allen Proben aufgelockert. Es ist daher davon auszugehen, dass es beim Herstellen der Proben zum teilweisen Abriss dieser äußersten Schicht gekommen ist. Auf einen Vergleich der epidermalen Dicke wird daher verzichtet. In der komplett erhaltenen Epidermis wird deutlich, dass die Verdickung der Epidermisschichten bei Tieren aller Fütterungsgruppen sehr stark ausgeprägt ist. Der Anteil der lebenden Epidermis umfasst von der Basis der Sekundärpapillen aus betrachtet fast immer 15 bis 20 Zelllagen. Das Stratum corneum erreicht eine Höhe von 200 - 250 µm. Das Auftreten von exsudativen Plaques ist in den Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere, soweit sie nicht durch einen großflächigen Ulkus zerstört wurden, immer zu erkennen, in der Standardgruppe ist es dagegen nur bei vier Proben und zudem auch schwächer ausgeprägt. Oberflächliche Läsionen kommen in einer Probe der Standardtiere und zwei Proben der doppelt biotindosierten Tiere vor. Ein oberflächlicher Ulkus ist in einer Probe der Standardgruppe zu erkennen, ein die Basalmembran durchbrechender Ulkus kommt in zwei Proben der Standardgruppe, fünf Proben der doppelt biotindosierten Tiere und sechs Proben der vierfach biotindosierten Tiere vor. Proben ohne Läsionen oder Ulzera kommen nur aus der Gruppe der Standard- und vierfach biotindosierten Tiere zur Untersuchung.

3.1.2.3. Die Befunde der H.E.-Übersichtsfärbung nach 21 Wochen

Die Präparate der Tiere im Alter von 21 Wochen sind unabhängig von der Fütterungsgruppe durch das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Veränderungen unterschiedlicher Ausprägung gekennzeichnet. Ein Vergleich der Häufigkeit ihres Vorkommens zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen ist daher zum Teil schwierig.

Der Papillarkörper ist in den meisten Proben sehr unregelmäßig. In fast allen Proben gibt es Areale mit stark verlängerten, spitz zulaufenden Primärpapillen, die an ihrer Basis stark verengt sind (Abb. 3b). Flache Papillen sind ca. 0,5 mm hoch und 1 mm breit, besonders hohe Papillen erreichen eine Ausdehnung von 1 mm Höhe und 0,7 mm Breite. In den verlängerten Primärpapillen sind die Sekundärpapillen besonders stark ausgebildet und der Anteil der lebenden Epidermis weist einen Höhenunterschied (s. o.) von zwei bis fünf Zelllagen bzw. 15 bis 20 µm auf. Die interpapillären Furchen sind unabhängig von der Länge der Schuppen in allen untersuchten Proben mit Hornzellen ausgefüllt, in Bereichen mit besonders langen Schuppen erscheinen diese Hornzellen zum Teil unscharf strukturiert. Doppelte Nucleoli sind in allen Proben zu erkennen, in den Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Tiere häufiger als in denen der vierfach biotindosierten Tiere. Sie sind stets beschränkt auf das untere und mittlere Drittel des Stratum intermedium. Im Vergleich zu den anderen Fütterungsgruppen sind perinukleäre Freiräume in den Proben der Standardgruppe seltener vorhanden. In den Proben der vierfach biotindosierten Tiere sind sie vereinzelt auch im oberen Drittel des Stratum intermedium aufzufinden. Eine Verdickung der Epidermis ist in dieser Altersstufe zum Teil sehr deutlich. Von der Basis der Sekundärpapillen ausgehend umfasst der Anteil der lebenden Epidermis in flachen Papillen ca. 10 Zelllagen (25 µm), das Stratum corneum erreicht eine Höhe von 200 µm. Bei besonders ausgeprägter Verdickung erreicht der lebende Epidermisanteil eine Höhe von 150 µm, das darüber liegende Stratum corneum eine Dicke von 400 µm. In den untersuchten Proben der vierfach biotindosierten Tiere ist das Auftreten exsudativer Plaques nur einmal, in den beiden anderen Fütterungsgruppen drei- bzw. viermal zu beobachten. In keiner der untersuchten Proben der Standardgruppe ist eine rein oberflächliche Läsion des Stratum corneum zu erkennen, in zwei Proben dieser Gruppe sind tiefe Ulzera vorhanden, welche sich in einem Fall über das gesamte Präparat ausdehnen. In den acht untersuchten Proben der doppelt biotindosierten Tiere zeigen die Hälfte tiefe Ulzera, bei den vierfach biotindosierten Tieren kommen fünf Proben mit tiefreichenden Ulzera vor, wovon zwei das gesamte Präparat einnehmen. Drei Präparate lassen keine Läsionen erkennen.

In direkter Nachbarschaft zu vorhandenen tiefgreifenden Läsionen kann eine hohe Mitose-tätigkeit der Basalzellen beobachtet werden. In allen Schichten bilden sich intra- und extrazelluläre Ödeme aus. Auch die Hornzellen sind weniger azidophil angefärbt und

unscharf strukturiert (Abb. 3b). Innerhalb der Läsion kommen randständig einzelne stark ödematisierte Intermediärzellen vor. Zum Teil ziehen „Hornzellstraßen“ in die Läsion hinein und sind mit dieser scheinbar fest verschmolzen. Stellenweise ist die Läsion oberflächlich von einem Saum kernrethaltiger, aufgeschwemmter Hornzellen überlagert (Abb. 3b). Von dermalen Seite kann eindeutig erkannt werden, dass es zum Einwandern von Fibroblasten in die Läsion kommt. Auch sind innerhalb der Läsion schattenhaft Gefäßschlingen zu erkennen. In solchen Fällen ziehen randständig neue Basalzellen unter Bildung einer neuen Basalmembran in die Läsion hinein.

Als Besonderheit finden sich in den Proben dieser Altersstufe häufig auch Areale, in denen die Dermis dicht gepackte kollagene Fasern und eine Vielzahl von Fibroblasten und Kapillarschlingen aufweist. Primärpapillen sind in diesen Bereichen nicht deutlich zu erkennen. Der Papillarkörper ist stattdessen langgestreckt und glatt. Es können noch flache, stumpfe, seltener auch etwas höhere Sekundärpapillen vorhanden sein (Abb. 5b). Der Anteil der ca. 10 bis 13 Zelllagen umfassenden lebenden Epidermis ist immer flach (ca. 50 µm) und wird von einer vergleichsweise dicken Hornzellschicht überlagert (200 µm). In einem Fall ist dieser Hornzellschicht oberflächlich ein exsudativer Plaque aufgelagert.

3.2. Die Befunde der Perjodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion

Dermale Strukturen und die Basalmembran reagieren immer stark PAS-positiv, das Stratum basale dagegen immer negativ. Im Stratum intermedium kann es intrazellulär zu einer diffusen, undeutlichen, schwach positiven PAS-Reaktion kommen, wodurch die Zellen marmoriert erscheinen. In Richtung Hautoberfläche verstärkt sich diese Reaktion etwas, bleibt jedoch insgesamt schwach positiv. Die Zellgrenzen und der Interzellularraum des mittleren und oberen Drittels des Stratum intermedium reagieren mit kontinuierlicher Zunahme der Intensität stärker PAS-positiv als die Intrazellularräume. Die Zellkontakte dieser Stachelzellen sind dabei besonders deutlich zu erkennen. Eine Abgrenzung zwischen dem Stratum intermedium und dem Stratum transitivum ist lichtmikroskopisch nicht eindeutig möglich. Je älter die Tiere werden, desto deutlicher stellt sich der Transitivbereich in der Übersicht als breiter, PAS-positiv reagierender Saum dar. In höherer Vergrößerung ist eine PAS-positive Reaktion des Intrazellularraums generell selten und schwach erkennbar. Die Zellgrenzen reagieren stark PAS-positiv. Innerhalb dieses Saumes sind die Zellkerne in ihrem Heterochromatin unterschiedlich stark kondensiert. Das Stratum corneum reagiert in allen untersuchten Altersstufen unabhängig von den Fütterungsgruppen unregelmäßig PAS-positiv. Dabei ist die Reaktion stärker als in den lebenden Hautanteilen und bleibt bis zur Oberfläche erhalten. In den netzartig aufgetrennten Bereichen (siehe Kapitel 3.1.1.) stellen

sich die Zellgrenzen besonders deutlich dar. Diastaseinkubation ändert das Reaktionsverhalten nicht.

3.2.1. Die Befunde der PAS-Reaktion

Vergleich der Fütterungsgruppen pro Altersstufe

In Anhang 3 Tabelle 2 ist ein vergleichender Überblick der wichtigsten Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

3.2.1.1. Die Befunde der PAS-Reaktion nach 6 Wochen

Im Alter von 6 Wochen ist in den Proben der Standardgruppe eine schwach PAS-positive Reaktion des Intrazellularraums der Intermediärzellen zu erkennen. In den Proben der doppelt biotindosierten Tiere ist diese Reaktion weniger deutlich und in den Proben der vierfach biotindosierten Tiere gar nicht zu beobachten. Die Zellgrenzen und der Interzellularraum der Intermediärzellen reagieren im Alter von 6 Wochen in den Proben der Standardgruppe am stärksten positiv. Zwischen den Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere kann diesbezüglich kein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Eine positive intrazelluläre Reaktion im Bereich der Transitivzellen ist generell sehr selten, in den Proben der doppelt biotindosierten Tieren mit mäßiger Reaktionsintensität zu beobachten. Jeweils drei Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere und fünf der Standardtiere weisen intrazellulär im oberen Drittel des Stratum intermedium stark positiv reagierende, diastasestabile, granuläre Strukturen (Vesikel) auf (Abb. 4a, b und c). Gleichzeitig zeigt das darüber liegende Stratum corneum meist ebenso stark positiv reagierende, strukturlose und unscharf begrenzte intrazelluläre blasige Erweiterungen. In der Umgebung solcher Bezirke sind die Hornzellen aufgequollen und schwächer PAS-positiv angefärbt. Gleichzeitig nimmt die Azidophilie in der H.E.-Färbung dort ab (Abb. 4d).

3.2.1.2. Die Befunde der PAS-Reaktion nach 14 Wochen

Mit 14 Wochen ist in den Proben der Standardtiere am häufigsten eine schwache PAS-positive Reaktion des Intrazellularraums der Intermediärzellen zu beobachten, niemals in denen der vierfach biotindosierten Tiere. Die Reaktion der Zellgrenzen und des Interzellularraums der Intermediärzellen ist im Vergleich zu den 6 Wochen alten Tieren generell schwächer ausgeprägt und kommt in den Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe bei sieben bzw. sechs Proben vor, in der vierfach biotindosierten Gruppe dreimal. Eine positive intrazelluläre Reaktion der Transitivzellen ist mit 14 Wochen ausschließlich in maximal der Hälfte der Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere zu beobachten. Intrazelluläre Granula der Intermediärzellen und blasige Erweiterungen

im Stratum corneum verhalten sich in der Häufigkeit ihres Auftretens ebenso wie bei den 6 Wochen alten Tieren.

3.2.1.3. Die Befunde der PAS-Reaktion nach 21 Wochen

Die Auswertung der PAS-Reaktionen wird in den Proben der 21 Wochen alten Tiere durch das gleichzeitige Auftreten unterschiedlichster Veränderungen in einem Präparat erschwert. Die folgenden Beobachtungen werden, falls nicht anders beschrieben, an unveränderten Bereichen gemacht.

Während der Intrazellularraum der Intermediärzellen in den Proben der Standard- und vierfach biotindosierten Tiere nur schwach reagiert, tritt bei zwei Proben der doppelt biotindosierten Tiere eine stärkere Reaktion auf. Die Zellgrenzen und Interzellularräume der Intermediärzellen reagieren in den Proben der doppelt biotindosierten Tiere am stärksten PAS-positiv. In den Proben der Standardgruppe ist diese Reaktion weniger intensiv als in den Proben der vierfach dosierten Tiere, bei denen sie häufig erst ab dem mittleren Drittel des Stratum intermedium nachweisbar ist. Eine intrazelluläre Reaktion der Transitivzellen ist in dieser Altersstufe schwer zu beurteilen, da es aufgrund vorhandener Veränderungen zum Aufquellen der Zellen im Transitivbereich oder zum vollständigen Fehlen des PAS-positiven Saumes kommt. In den Intermediärzellen der Proben der Standardgruppe sind keine intrazellulären Granula vorhanden, im äußersten Stratum corneum dieser Proben werden dagegen noch blasige Erweiterungen beobachtet. Das Auftreten von intrazellulären Granula der Intermediärzellen verbunden mit blasigen, stark PAS-positiv reagierenden Erweiterungen im Stratum corneum ist in allen Proben der vierfach biotindosierten Tieren und in ca. der Hälfte der Proben der doppelt biotindosierten Tiere zu beobachten.

3.3. Der Sulfhydryl- und Disulfidgruppennachweis (SH- / SS-Gruppennachweis)

Aufgrund der Ergebnisse der Futteranalyse wird bei den Tieren im Alter von 21 Wochen auf den SH- / SS-Gruppennachweis verzichtet.

Bei den Tieren im Alter von 6 und 14 Wochen fallen im Allgemeinen die Reaktionsintensitäten des Sulfhydrylgruppennachweises (SH-Gruppen) schwächer aus als die der Disulfidbrücken (SS-Gruppen). Beide Reaktionen verhalten sich im Vergleich kongruent: Je schwächer oder stärker der SH-Gruppennachweis ausfällt, desto schwächer oder stärker ist auch der SS-Gruppennachweis. Der Nachweis von SH-Gruppen verläuft in allen Proben bereits im Stratum basale schwach positiv und bleibt in seiner Intensität bis zum Erreichen des oberen Drittels des Stratum intermedium gleich. In den unteren Zellschichten ist diese Reaktion intrazellulär flächig, in den höheren Schichten scheint sie durch Strukturen vermittelt zu werden, die den Intrazellularraum netzartig durchziehen, bei gleichzeitiger

Betonung der Zellgrenzen. Es kommt beim Übergang entweder zum Transitivbereich oder zum Stratum corneum, seltener auch in beiden Fällen, zu einem weiteren Anstieg der Reaktionsintensität. Bis zur Hälfte bzw. mindestens zum äußersten Drittel des Stratum corneum verändert sich die Reaktionsintensität nicht. Darüber ändert sich die Situation und die Reaktion fällt abrupt negativ aus.

Der SS-Gruppennachweis verläuft je nach Altersstufe unterschiedlich (s. u.). Für beide Altersstufen gilt, dass sich die Reaktionsintensität meist erst im oberen Drittel des Stratum intermedium verstärkt. Im weiteren Verlauf nimmt die Reaktionsintensität kontinuierlich zu und bleibt bis zur Oberfläche erhalten. Das äußere Drittel des Stratum corneum reagiert immer etwas abgeschwächt. Die Zunahme der Reaktionsintensitäten ist bei dem SS-Gruppennachweis im Vergleich zum SH-Gruppennachweis stärker ausgeprägt.

Im oberen Drittel des Stratum intermedium kommen intrazellulär überwiegend am Grund der interpapillären Furchen Granula vor, die auf beide Nachweismethoden in gleicher Intensität reagieren.

Der kombinierte Nachweis von SH- und SS-Gruppen (Red DDD) spiegelt die Verhältnisse der Einzelreaktionen wieder. Der Nachweis reduzierender Nicht-SS-Gruppen (Block DDD) verläuft in allen Schichten negativ.

3.3.1. Die Befunde des SH- / SS-Gruppennachweises

Vergleich der Fütterungsgruppen pro Altersstufe

In Tabelle 10 sind die Bezeichnungen der Reaktionsintensitäten in Abhängigkeit des Farbtons dargestellt. Im Überblick der Beurteilungen (Anhang 3, Tab. 3) wird deutlich, dass in den oberen epidermalen Schichten, v. a. der Tiere im Alter von 14 Wochen, die Reaktionsintensitäten innerhalb der Fütterungsgruppen sehr uneinheitlich ausfallen.

Tabelle 10: Bezeichnung der Reaktionsintensität beim SH- / SS-Gruppennachweis in Abhängigkeit vom Farbton (in Anlehnung an Korte, 1987)

Reaktionsintensität	Färbung	Gehalt an SH- / SS-Gruppen
0 = keine Reaktion	farblos	niedriger Gehalt an SH- / 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- / SS-Gruppen

3.3.1.1. Die Befunde des SH- / SS-Gruppennachweises nach 6 Wochen

Im Alter von 6 Wochen fallen beide Nachweisreaktionen in den Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Tiere ähnlich aus und schwächer als bei den Tieren mit vierfacher Biotindosierung. Im oberen Drittel des Stratum intermedium liegt der zuvor schwache SH-Gruppennachweis in den Standard- und doppelt biotindosierten Gruppen bei einer Intensität von 2, in der Gruppe der vierfach biotindosierten Tiere hauptsächlich bei 3. Im Transitivbereich und im Stratum corneum erreichen die Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppen eine Intensität von 3 und 4, die der vierfach biotindosierten Gruppe eine Intensität von 4 und 5. Beim Übergang zum Transitivbereich ist ein sprunghafter Anstieg der Reaktionsintensität um zwei Bewertungspunkte in allen Fütterungsgruppen gleichermaßen selten zu beobachten. Beim Übergang zum Stratum corneum kommt dies nicht vor.

Der Nachweis von SS-Gruppen verläuft in allen Proben bis zum mittleren Drittel des Stratum intermedium negativ. Die Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Tiere erreichen im oberen Drittel des Stratum intermedium eine Intensität von 2 und 3 und die der vierfach dosierten Tiere die Intensitäten 3 und 4. Im Transitivbereich liegt die Reaktionsintensität in der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe bei Stufe 3, in der vierfach biotindosierten Gruppe kann eine Intensität von 5 erreicht werden. Im Bereich des Stratum corneum werden in den Standard- und doppelt biotindosierten Gruppen Intensitäten von bis zu 5, in der vierfach biotindosierten Gruppe dagegen nur bis zu 6 erreicht.

Die im Stratum intermedium vorkommenden intrazellulären Granula reagieren auf beide Nachweise in der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe mit einer Intensität von 3 oder 4, in der vierfach biotindosierten Gruppe mit 4 oder 5.

3.3.1.2. Die Befunde des SH- / SS-Gruppennachweises nach 14 Wochen

Im Alter von 14 Wochen kommt es generell zu stärkeren Reaktionen. Die Standardgruppe reagiert dabei etwas schwächer als die sich ähnelnden Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere.

In den Strata basale und intermedium liegt die Reaktionsintensität des SH-Gruppennachweises in den Proben der Standard- und doppelt biotindosierten Tiere zum Teil bei 2 und verläuft dadurch etwas stärker als in denen der vierfach biotindosierten Tiere. Im oberen Drittel des Stratum intermedium reagieren die Proben der Standardgruppe mit einer Intensität von 2 und 3. Die Proben der doppelt und vierfach biotindosierten Tiere reagieren meist mit einer Intensität von 4, aber zum Teil nach sprunghaftem Anstieg auch mit 5. In den Proben der doppelt biotindosierten Tiere kommen auch Intensitäten von 2, in denen der vierfach biotindosierten Tiere von 3 vor. Beim Übergang zum Transitivbereich kommt es

in den Proben der Standardgruppe häufiger als in denen der doppelt biotindosierten Gruppe zu einem sprunghaften Anstieg der Reaktionsintensität. In der Standardgruppe werden dabei Intensitäten von 3 bis 5, in der doppelt biotindosierten Gruppe von 4 und 5 erreicht. Die Proben der vierfach dosierten Gruppe reagieren im Transitivbereich mit einer Intensität von 3 bis 5. Der nachfolgende Übergang zum Stratum corneum kann je nach Probe in allen Fütterungsgruppen sprunghaft verlaufen. Die Proben der Standardgruppe reagieren dabei mit einer Intensität von 5, in einem Fall von 3, die der doppelt biotindosierten Tiere vornehmlich mit 6, in einem Fall auch 5, und bei den vierfach dosierten Tieren liegt die Reaktion zwischen 4 und 7.

Der SS-Gruppenachweis verläuft bereits im Stratum basale positiv und liegt in der Standard- und vierfach biotindosierten Gruppe bei 1, in der doppelt biotindosierten Gruppe, mit Ausnahme einer Probe, bei 2. In einer Probe der Standardgruppe ist erst ab dem mittleren Drittel des Stratum intermedium eine Reaktion nachweisbar. Von allen Fütterungsgruppen sind Proben vorhanden, bei denen es am Übergang zum oberen Drittel des Stratum intermedium zu einem sprunghaften Ansteigen der Reaktionsintensitäten kommt. In den Proben der vierfach biotindosierten Tiere ist dies besonders häufig. In der Standardgruppe findet man in diesem Bereich Intensitäten von 2 und 3. In der doppelt biotindosierten Gruppe kommen Intensitäten von 4 und 5 vor, aber hauptsächlich 2. In der Gruppe der vierfach dosierten Tiere liegt die Reaktionsintensität im oberen Drittel des Stratum intermedium bei 3 und 4. Beim Übergang zum Transitivbereich kommt es in der Standardgruppe, seltener auch in der Gruppe der doppelt biotindosierten Tiere, und in einer Probe der vierfach biotindosierten Tiere zu einem sprunghaften Anstieg der Reaktionsintensität. In der Standardgruppe liegt sie hauptsächlich bei 3, in jeweils einem Fall auch bei 4 oder 5. In der doppelt biotindosierten Gruppe liegt die Intensität bei 4 und 5, in einem Fall bei 6. Die Proben der vierfach biotindosierten Tiere reagieren mit einer Intensität von 5, in jeweils einem Fall auch 3 oder 4. In allen Fütterungsgruppen kann je nach Probe der Übergang zum Stratum corneum mit einem sprunghaften Anstieg der Intensität einhergehen. In der Standardgruppe werden im Stratum corneum Werte von 5 und 6 erreicht, in der doppelt biotindosierten Gruppe liegen sie bei 6 und 7 und in der vierfach biotindosierten Gruppe hauptsächlich bei 6, in jeweils einer Probe bei 5 und 7. Die äußere Schicht des Stratum corneum reagiert um jeweils einen Bewertungspunkt schwächer.

3.4. Die Sudanschwarz-B-Färbung

Bei den Proben der Tiere im Alter von 21 Wochen wird auf die Färbung mit Sudanschwarz B verzichtet.

Mit der Sudanschwarz-B-Färbung (Abb. 15c) kann intrazellulär im Stratum intermedium eine tröpfchenförmige Fettreaktion nachgewiesen werden. Die Größe und Anzahl der Tröpfchen nehmen in Richtung der Hautoberfläche kontinuierlich zu. Die einzelnen Tröpfchen fließen allmählich zusammen und bilden schließlich einen homogenen, deutlich darstellbaren, großen intrazellulären Tropfen. Ein Stratum transitivum kann auch bei dieser Färbung nicht eindeutig ausgemacht werden. Während die ersten Hornzelllagen noch eine das Zellinnere zu ca. zwei Drittel ausfüllende, flächig positive Fettreaktion zeigen, ist bei der notwendigen Schnittdicke der Proben innerhalb des darüber liegenden Stratum corneum eine Unterscheidung in Intra- und Extrazellularraum sehr schwierig. Generell erscheint der Bereich des äusseren Stratum corneum marmoriert. In Bereichen, in denen der Intrazellularraum vom Extrazellularraum unterschieden werden kann, ist deutlich zu erkennen, dass die Marmorierung von intrazellulären, nicht mit Sudanschwarz reagierenden Strukturen verursacht wird. In diesen Bereichen ist ebenfalls zu erkennen, dass die Zellgrenzen (Zellmembranen) positiv auf den Fettnachweis reagieren. Die Intensität der Fettreaktion im Stratum corneum ist abhängig vom Fettgehalt der lebenden Epidermis. Dadurch erscheinen die Zellen des Stratum corneum umso heller, je weniger Fetttröpfchen in der lebenden Epidermis nachgewiesen werden konnten.

3.4.1. Die Befunde der Sudanschwarz-B-Färbung

Vergleich der Fütterungsgruppen pro Altersstufe

Bezüglich der Anzahl und Größe sowie quantitativen Zunahme der Fetttröpfchen bestehen zwischen den verschiedenen Proben Unterschiede. Ein Zusammenhang des Vorkommens bestimmter Befunde mit dem Alter der Tiere oder der Fütterungsgruppe ist nicht ersichtlich.

3.4.1.1. Die Befunde der Sudanschwarz-B-Färbung nach 6 Wochen

Mit 6 Wochen erscheinen die ersten Sudanschwarz-positiven Fettreaktionen in Form von deutlichen Tropfen im mittleren Drittel des Stratum intermedium. Bei diesen Proben kommt es ab dem oberen Drittel des Stratum intermedium zu einem Zusammenfließen der Tröpfchen.

3.4.1.2. Die Befunde der Sudanschwarz-B-Färbung nach 14 Wochen

Mit 14 Wochen erscheinen die ersten Fettreaktionen in Form von feinstaubigen bis grobkörnigen Tröpfchen bereits im unteren Drittel des Stratum intermedium. Ein

Zusammenfließen dieser Tröpfchen ist erst in den obersten Intermediärzellen oder erst am Übergang zum Stratum corneum deutlich und häufig unvollständig. Die Marmorierung des Stratum corneum ist bei diesen Proben besonders stark ausgeprägt.

4. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (SEM¹)

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung spiegelt die Beobachtungen der lichtmikroskopischen Ergebnisse wieder. Daher wird im Folgenden auf einen Vergleich der Fütterungsgruppen verzichtet. An der dermalen Oberfläche kann man den Papillarkörper mit den flachen, noppenartig abgerundeten Primärpapillen erkennen, aus denen oberflächlich wiederum die Sekundärpapillen als kleine, abgerundete Unebenheiten hervorgehen. Die Anordnung der Papillen ist in unveränderten Hautbereichen gleichmäßig. Die Primärpapillen stehen eng beieinander und werden durch flache, schmale interpapilläre Furchen voneinander getrennt (Abb. 7a). Der Papillarkörper und die innere epidermale Oberfläche verhalten sich wie Matrize und Patrize zueinander. Die innere Oberfläche der Epidermis bildet zur Aufnahme der Primärpapillen honigwabenartig geformte Kappen (Abb. 8a). Die Waben werden durch solide Grenzwälle getrennt. Jede Wabe weist kleine Einsenkungen zur Aufnahme der Sekundärpapillen auf. Beide beschriebenen Oberflächen sind im Allgemeinen rau. Stellenweise sind sie von einer dünnen, glatten Schicht überzogen, die teilweise abstehende Stege bildet und als Basalmembran identifiziert wird (Abb. 6a). Die äußere epidermale Oberfläche (Abb. 9a) stellt das Äquivalent zu den dermalen Strukturen dar. Die Primärpapillen sind formgebend für die an der äußeren Epidermisoberfläche erkennbaren reticulate scales. Diese Schuppen stehen eng beieinander und sind durch flache interpapilläre Furchen voneinander getrennt. Oberflächlich erscheinen die Schuppen aufgeraut, und es kommt zur Abschilferung einzelner Hornzellen, selten auch kleiner Hornzellverbände. Als Folge von Schrumpfungsprozessen bei der Bearbeitung der Proben (Trocknungsartefakt) kann die Schuppenoberfläche zentral dezent eingedellt sein.

In den Proben ist eine unterschiedlich ausgeprägte Verlängerung der Primärpapillen (Abb. 7b) erkennbar und damit auch der einzelnen Schuppen. Die Sekundärpapillen können je nach Ausprägung ihrer Verlängerung fingerförmig von der Oberfläche der Primärpapillen abstehen (Abb. 7c). Die an der inneren epidermalen Oberfläche sichtbaren Waben und Einsenkungen vertiefen sich entsprechend und werden röhrenförmig (Abb. 8b). Die Gleichmäßigkeit der Anordnung der Papillen verliert sich, und es kann eine verminderte Dichte der Papillen beobachtet werden. Die interpapillären Furchen des Papillarkörpers werden bei Verlängerung und erniedrigter Dichte der Primärpapillen bzw. der Schuppen tiefer und

¹ engl.: sanning electron microscopy

breiter. Sehr stark verlängerte Primärpapillen bzw. Schuppen neigen vor allem an den Fußballenrändern dazu, sich schieferplattenartig zu überlappen. Sowohl die suprapapilläre als auch die interpapilläre äußere Epidermisoberfläche sind zum Teil stark aufgelockert. Es treten Risse auf, und es kann zur Abschilferung ganzer Klumpen von Hornzellverbänden kommen (Abb. 9b). An den sagittal angeschnittenen Probenrändern kann eine deutliche Auflockerung der epidermalen Zellreihen des Stratum corneum als Zeichen des Verlustes der Hornzellintegrität beobachtet werden.

Die Veränderungen können mit diffus variierender Ausprägungsstärke in den Proben aller Fütterungsgruppen gefunden werden. Nach 14 Wochen kommt es zu einer generellen Verstärkung des Schweregrades der Veränderungen.

Die bei einigen Tieren nach 21 Mastwochen lichtmikroskopisch beobachtete Glättung des Papillarkörpers und der epidermalen Oberfläche ist auch im Rasterelektronenmikroskop deutlich zu erkennen (Abb. 6). An der dermalen Oberfläche des Papillarkörpers sind keine Primärpapillen zu erkennen, sondern kleine Leisten mit zapfenartigen Vorstülpungen an der Oberfläche, die im Erscheinungsbild den fingerförmig verlängerten Sekundärpapillen ähneln (Abb. 6a). Entsprechend kann an der inneren epidermalen Oberfläche keine Wabenstruktur erkannt werden (Abb. 6b). Einzelne reticulate scales sind an der äußeren epidermalen Oberfläche nicht zu identifizieren.

5. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung (TEM)

Aufgrund des äußerst kleinen Auswahlbereichs der Gewebeproben fokussiert die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung auf die Darstellung der Feinstruktur der lichtmikroskopisch gewonnenen Erkenntnisse. Da beinahe alle Proben der Tiere des Hauptversuchs Veränderungen aufweisen, werden im Folgenden zunächst die Beobachtungen der makroskopisch unveränderten Hautproben der 21 Wochen alten Tiere des Wiederholungsversuchs beschrieben. Im Anschluss werden unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Altersstufen die Abweichungen der beschriebenen Verhältnisse dargestellt, die bei den Tieren des Hauptversuchs vorkommen. Grundsätzlich sind Abweichungen von den Verhältnissen der makroskopisch unveränderten Hautproben der Tiere des Wiederholungsversuchs in der Umgebung von Läsionen oder Ulzera, die in den Proben der 14 Wochen alten Tiere gehäuft auftreten, besonders deutlich zu erkennen. Auf den Vergleich der Fütterungsgruppe wird verzichtet.

Im zentralen Anteil des Stratum corneum ist an den fixierten und eingebetteten Proben eine mangelhafte Schwarzfärbung, die durch die Postfixation mit Osmiumtetroxid zustande kommt, sichtbar. Bei der Herstellung der Semidünnschnitte kommt es im Zentrum des Stratum corneum zu einer netzartigen Auffaserung (Abb. 10a und b). In diesem Bereich fehlt

auch eine Anfärbung des Gewebes mit Methylenblau. Offensichtlich ist bei der Postfixation das Osmiumtetroxid in diesen Bereich nicht ausreichend eingedrungen. Im Übrigen erhält man einen sehr guten Überblick zur Auswahl geeigneter Bereiche für die Ultradünnschnittherstellung. Im Semidünnschnitt lassen sich die Quantität und Verteilung der intrazellulären Fettvakuolen und Keratinfilamentbündel besonders eindrucksvoll darstellen. Die Herstellung von Ultradünnschnitten zur transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung gestaltet sich im Allgemeinen schwierig. Unabhängig von der netzartigen Auffaserung des Stratum corneum neigen vor allem Areale bereits makroskopisch veränderter Haut zu Zerreißen.

5.1. Die Innervation der Metatarsalballen

In den Semidünnschnitten ist zu erkennen, dass sich an der Grenze zwischen Dermis und Subcutis große gemischte Nervenfaserbündel befinden. Von diesen ziehen kleinere Äste von sowohl marklosen als auch markhaltigen Nervenfasern in Richtung Epidermis (Abb. 11a). Im elektronenmikroskopischen Präparat (Abb. 11b) wird deutlich, dass die markhaltigen Nervenfasernäste in direkter Nachbarschaft zur Epidermis helle, bulboid erweiterte Nervenendigungen besitzen, die Mitochondrien und osmiophile Vesikel enthalten. In einer Probe ist deutlich zu erkennen, dass diese Endigungen in direktem Kontakt zu Merkelzellen stehen können. Diese spezialisierten kernhaltigen Mechanorezeptorzellen sind anhand der vorhandenen kleinen, stark osmiophilen, membranumhüllten Vesikel, den sog. dense core Vesikeln, zu identifizieren. In der betroffenen Probe können in der Dermis unterhalb der Epidermis zwei direkt benachbarte Merkelzellen erkannt werden, an die sich mehrere Nervenendigungen der ehemals markhaltigen Nervenfasern direkt anlagern.

5.2. Das Stratum basale

Die Basalzellen der Epidermis der Mittelfuß- und Digitalballen sind hochprismatisch und liegen der Basalmembran direkt auf. Elektronendichte Hemidesmosomen stellen die Verbindung der Basalzellen mit der Lamina basalis der Basalmembran her. Sehr feine, kurze Tonofilamente ziehen von den Hemidesmosomen ins Zellinnere. An der basalen Zellmembran sind kleine Pinozytosevesikel zu erkennen. Die Zellmembranen benachbarter Basalzellen sind stark verzahnt. Als Zellkontakte kommen Desmosomen in großer Anzahl vor. Häufig treten optisch leere, kleinblasige Erweiterungen des Interzellularraums zwischen den Basalzellen und teilweise auch zu den darüber liegenden Intermediärzellen auf. Die Zellkerne sind hochoval, liegen stets zentral und nehmen etwa ein Drittel des Zellinhalts ein. Mitunter kann der perinukleäre Raum am basalen Kernpol leicht erweitert und mit einem feinkörnigen bis feinstaubigen Material mittlerer oder schwacher Elektronendichte gefüllt

sein. Die am häufigsten vorzufindenden Zellorganellen sind freie Ribosomen und Polyribosomen. Ferner sind Mitochondrien vom Cristatyp sowie raues endoplasmatisches Retikulum (rER) in relativ großer Menge vorhanden. Golgi-Apparate sind im Stratum basale der untersuchten Proben nicht sichtbar. Es ist ein Zytoskelett aus feinen Filamentfasern ausgebildet, die zu kleinen, lockeren Filamentbündeln zusammengelagert sein können. Sowohl diese Bündel als auch ungebundelte Keratinfilamentfasern verlaufen senkrecht zur Basalmembran und häufig kernnah. Zufällig im Zytoplasma angeordnete Fetteinlagerungen können in mäßiger Anzahl beobachtet werden. Sie stellen sich als unregelmäßig geformte, unscharf begrenzte, optisch leere Aussparungen des Zytoplasmas dar. In den Basalzellen können keine multigranular bodies (MGBs) nachgewiesen werden.

5.2.1. Erkennbare Abweichungen der beschriebenen Verhältnisse im Stratum basale

Nach 6 Wochen ist eine starke, fingerförmige Verlängerung der Sekundärpapillen zu beobachten. Die basale Zellgrenze der Basalzellen zeigt einen unregelmäßigen Verlauf. Die Zellmembranen benachbarter Basalzellen können mitunter nur mäßig verzahnt sein. Die Interzellularräume zwischen den Basalzellen können stellenweise so stark erweitert sein, dass es zu einer scheinbaren Zusammenhangstrennung einzelner Basalzellen von ihrer Umgebung und einem Verlust der typisch hochprismatischen Form kommt. Im erweiterten Interzellularraum befinden sich dann Inseln aus elektronendichtem, körnigem Material sowie eine Vielzahl scheinbar frei liegender Desmosomen (Abb. 14a). Weiterhin kommen Proben vor, in denen das Zytoskelett undeutlich ausgebildet ist.

Im Alter von 14 Wochen ist in manchen Proben eine fingerförmige Verlängerung der Sekundärpapillen und ein unregelmäßiger Verlauf der basalen Zellmembran zu beobachten. Die Interzellularräume zwischen den Basalzellen und auch zu den Intermediärzellen sind extrem stark erweitert. Zum Teil sind die Zellkerne unregelmäßig geformt und zeigen eine prominente Kondensation ihres Heterochromatins. Auch eine starke Dezimierung des Organellenbesatzes bei gleichzeitig auffällig starkem Vorkommen von Keratinfilamenten kann beobachtet werden. Fetteinlagerungen sind grundsätzlich selten zu beobachten.

5.3. Das Stratum intermedium

In der ersten Lage des Stratum intermedium sind die Zellen noch hochprismatisch. Bereits ab der zweiten Zelllage flachen die Intermediärzellen zur Oberfläche hin kontinuierlich und zügig ab, sind zunächst noch kubisch und schließlich platt. Benachbarte Zellen sind im unteren Bereich dieser Schicht noch relativ stark verzahnt, zur Oberfläche hin begradigt sich der Interzellularraum stetig. Im unteren Drittel der Intermediärschicht bilden sich vereinzelt

überwiegend optisch leere, kleinblasige Erweiterungen des Interzellularraumes, die zur Oberfläche hin immer seltener vorkommen. Ansonsten enthält der Interzellularraum ein feinstaubiges bis feinkörniges Material. Desmosomale Zellkontakte sind im ganzen Stratum intermedium sehr zahlreich. Die Zellkerne passen sich zur Oberfläche hin der Zellform an und sind zunächst hochoval, dann rund und schließlich queroval. In den unteren Zelllagen füllen die Zellkerne die Breite der Zelle fast vollständig aus, wodurch sich größere Zellstrukturen an den Kernpolen konzentrieren. In den oberen Zellen mit querovalen Kernen ist dies schwächer ausgeprägt, in den kubischen Zellen sind die Organellen diffus im Zytoplasma verteilt. Bereits ab dem oberen Drittel des Stratum intermedium sind häufig degenerative Zellkerne zu erkennen, gekennzeichnet durch einen Mangel an Euchromatin und Vakuolisierung des Karyoplasmas. Die am häufigsten vertretenen Organellen der Intermediärzellen sind freie Ribosomen und Polyribosomen. Weiterhin sind eine Vielzahl von Mitochondrien vom Cristatyp häufig in Kernnähe vorhanden. Raues und glattes ER sind in relativ großer Anzahl diffus im Zytoplasma verteilt. Falls Golgi-Apparate vorhanden sind, werden sie im unteren und mittleren Drittel des Stratum intermedium vorgefunden. Mit Ausnahme der Ribosomen nimmt der Organellenbesatz in den oberen Zelllagen quantitativ ab. Das Zytoskelett wird während der Differenzierung stetig dichter, durch ihre Aggregation lagern sich die Keratinfilamente zu immer dickeren Bündeln zusammen. Solange die Zelle noch hochoval ist, richten sich die noch dünnen Keratinfilamentbündel vornehmlich an beiden Kernpolen vertikal entlang der Zell-Längsachse aus. Mit zunehmender Zusammenlagerung der Keratinfilamente und Abflachung der Zellen sind die Keratinfilamentbündel zunächst diffus in der Zelle verteilt und lagern sich dann zum Großteil peripher entlang der Zell-Querachse an. In den obersten Zelllagen kondensieren die Keratinfilamentbündel vermehrt zu homogenen, elektronendichten Hornschollen. Als intrazelluläre Fetteinlagerungen werden sowohl unscharf als auch scharf begrenzte rund und oval geformte Tropfen vorgefunden. Der Inhalt dieser Fetttropfen ist zum größten Teil herausgelöst, sodass sie optisch leer erscheinen. Zum Teil kann in den scharf begrenzten Fetttropfen randständig ein feinstaubiges, mäßig elektronendichtes Material nachgewiesen werden. Es kommt während der Differenzierung der Zellen zu einer kontinuierlichen Zunahme der scharf begrenzten Fetttropfen, die sich vornehmlich in Kernnähe befinden. Diese verschmelzen zu immer größeren Tropfen. Bereits ab dem unteren Drittel des Stratum intermedium liegt die Mehrheit der vorhandenen Fetttropfen dem Kern direkt an. Aufgrund der zur Oberfläche hin stetig wachsenden Größe der sich verschmelzenden Tropfen wird der Kern zunehmend eingedrückt, was in der letzten Zelllage sein Maximum erreicht (Abb. 13a). Multigranular bodies (MGBs) kommen bereits in der ersten Lage der Intermediärzellen vor und nehmen an Zahl und Größe im Laufe der Differenzierung mäßig zu. Sie sind im Allgemeinen an unterschiedlichsten Lokalisationen des Intrazellularraums auffindbar und

weisen meist eine runde bis rundovale Form auf. Bereits in den unteren Zelllagen können häufig granuläre Untereinheiten erkannt werden. Diese Granula werden durch die unterschiedliche Verlaufsrichtung der im Inneren vorhandenen parallel verlaufenden Membranstapel charakterisiert, die aus abwechselnd elektronendichten und elektronendurchlässigen Lamellen bestehen. In manchen Zellen des mittleren und oberen Drittels des Stratum intermedium liegen die MGBs nestartig vor (Abb. 12a). Die MGBs sind von einer Hüllmembran umgeben. Überwiegend im oberen Drittel des Stratum intermedium kommt es zu einer Auflösung (Vakuolisierung) der MGBs. In diesen Bereichen entstehen Fettvakuolen mit einer membranähnlichen Begrenzung. Teilweise können am Rande dieser Vakuolen Membranstapelreste erkannt werden.

5.3.1. Erkennbare Abweichungen der beschriebenen Verhältnisse im Stratum intermedium

Häufig sind in den untersuchten Proben der Tiere im Alter von 6 Wochen innerhalb des unteren Drittels des Stratum intermedium vermehrt kleinblasige Erweiterungen des Interzellularraums zu erkennen. Vor allem in den unteren Zelllagen des Stratum intermedium kommen blasige Erweiterungen des perinukleären rER vor, welche mit einem feinkörnigem Material gefüllt sind. Je nach Ausdehnung dieser Erweiterungen kann der Zellkern eingedrückt erscheinen. Doppelte Nucleoli sind in sehr vielen Zellen zu erkennen. Teilweise kommt es schon frühzeitig zu einer netzartigen Auflösung des Kerns, der dann hell erscheint. In diesem Alter sind in keiner der untersuchten Proben Golgi-Apparate sichtbar. In manchen Proben ist keine quantitative Zunahme von Fetteinlagerungen zu erkennen. MGBs sind nur selten gut zu erkennen und zum Teil erst ab dem mittleren Drittel des Stratum intermedium vorhanden. Generell sind sie ausgesprochen unscheinbar, klein (selbst bei 6300facher Vergrößerung noch undeutlich) und in sehr geringer Anzahl vorhanden. Sie weisen sehr unterschiedliche Formen auf. Vor allem in den unteren Abschnitten des Stratum intermedium erscheinen sie in Form von rundlichovalen Strukturen mit einem stark elektronendichten, homogenen Zentrum, umgeben von einem schwach elektronendichten Saum ohne scharfe Begrenzung zur Umgebung (Abb. 12b). Im Laufe der Differenzierung nehmen sie mäßig an Größe zu und sind rundoval, dreieckig oder annähernd birnenförmig (Abb. 12c). Selten ist eine Hüllmembran zu erkennen. Die typische multilamelläre Struktur in ihrem Inneren ist meist erst ab dem mittleren Stratum intermedium vorhanden und häufig kaum zu erkennen. Granuläre Untereinheiten werden in einem MGB einer Probe deutlich erkannt. Eine quantitative Zunahme kann nicht deutlich nachgewiesen werden. Fetttropfen mit randständigen Membranstapelresten sind im oberen Drittel des Stratum intermedium zu erkennen.

Bei den 14 Wochen alten Tiere ist das Vorkommen von blasigen Erweiterungen des Interzellularraums die Regel und kann bis in die höheren Lagen des unteren Drittels des Stratum intermedium reichen. Stellenweise kommen auch großblasige Erweiterungen vor, in denen sich fein- und grobkörniges Material hoher Elektronendichte und scheinbar frei liegende Desmosomen befinden. Es kommen sehr häufig Erweiterungen des perinukleären rER vor, zum Teil in Verbindung mit degenerativen Veränderungen des Zellkerns. Die Zellkerne des unteren und mittleren Drittels des Stratum intermedium lassen doppelte Nucleoli erkennen. Die Zellkerne der obersten Intermediärzellen zeigen Auflösungserscheinungen und starke Einziehungen. In den unteren Bereichen der Intermediärschicht kann durch die starke Auflockerung des Zytoplasma ein Zellödem erkannt werden. Erneut sind keine Golgi-Apparate sichtbar. Auffällig ist, dass im Vergleich zu den jüngeren Tieren ein stärker ausgeprägtes Zytoskelett vorliegt. Fetteinlagerungen sind im Stratum intermedium teilweise nur gering vorhanden und nehmen quantitativ nur mäßig zu. Demgegenüber sind im Vergleich zu den jüngeren Tieren häufiger scharf begrenzte Fetttropfen mit randständigen, lamellären Strukturen zu finden. MGBs sind vorhanden und besitzen unterschiedlichste Formen. Der lamelläre Inhalt ist im Vergleich zu den jüngeren Tieren häufiger und deutlicher zu erkennen, Granula jedoch nicht. Es kommen vereinzelt Zellen vor, in denen größere Anhäufungen von diffus im Zytoplasma verteilten MGBs zu finden sind.

Benachbart zu Ulzera oder Läsionen, die in das Stratum intermedium einbrechen, sind die Zellen meist vollständig untergegangen. Eingebettet in fein- und grobkörnigen Zelldetritus können dann Leukozyten mit sehr prominenten, intrazellulären, homogen osmiophilen Vesikeln erkannt werden. Zum Teil befinden sich im unteren Bereich des Stratum intermedium eingesprossete Kapillaren. Auch Anhäufungen von frei zwischen den Zellresten liegenden Erythrozyten sind zu erkennen. In einer Probe sind inmitten eines ulzerativen Areals noch Epidermisinseln zu erkennen, die starke Degenerationserscheinungen aufweisen und von einwandernden Entzündungszellen (pseudoeosinophile Granulozyten und Lymphozyten) eingeschmolzen werden.

5.4. Das Stratum transitivum (Der Transitivbereich)

Wie schon bei der lichtmikroskopischen Befunderhebung beschrieben, ist auch bei den ultrastrukturell untersuchten Proben die Identifikation des Stratum transitivum äußerst schwierig. Eine durchgängige oder gar mehrschichtige Übergangsschicht ist nie zu erkennen. Häufig kommen stattdessen vereinzelt Zellen oder kleine Gruppen von Zellen vor, die direkt unterhalb der Hornzellen liegen, jedoch im Erscheinungsbild weder diesen noch den Intermediärzellen ähneln (Abb. 13b). Diese mit Sicherheit als Übergangszellen zu identifizierenden Zellen sind relativ flach und langgestreckt. Sie sind mäßig verzahnt, weisen

sehr enge Zellzwischenräume auf und besitzen reichlich desmosomale Zellkontakte. Ein marginales Band² ist in den eindeutig identifizierten Transitivzellen nie zu erkennen! Mit Ausnahme von vereinzelt Ribosomen und Polyribosomen sind keine intakten Zellorganellen oder intakte Zellkerne zu identifizieren. Das Zytoplasma ist - zum Teil erheblich – aufgelockert, vereinzelt kommen diffus verteilte, unterschiedlich kleine Mengen eines elektronendichten, feinkörnigen Materials vor. Die Keratinfilamentbündel haben sich zu fast vollständig homogenen, scharfrandigen, elektronendichten Schollen unterschiedlicher Größe zusammengelagert. Solche Schollen geringeren Ausmaßes liegen diffus im Zytoplasma verteilt und es kommt in der Peripherie der Zelle zu einer randständigen Kondensation. Scharf begrenzte Fetteinlagerungen sind selten. In den untersuchten Proben sind nur vereinzelt vollständige MGBs sichtbar. Häufiger finden sich frei liegende Lamellenstapel oder solche, die teilweise von einer Membran umgeben sind und in direkter Nachbarschaft zu Fetteinlagerungen liegen.

5.4.1. Erkennbare Abweichungen der beschriebenen Verhältnisse im Transitivbereich

In den Proben der 6 Wochen alten Tiere kann die Zusammenlagerung der Keratinfilamente zu großen, homogenen Hornschollen ausbleiben. Im darüber liegenden Stratum corneum sind die typischen Hornschollen dennoch vorhanden. In mehr als der Hälfte der untersuchten Proben sind die Hornschollen in den Transitivzellen eher zentral als peripher angeordnet.

Bei den 14 Wochen alten Tieren sind Transitivzellen nicht eindeutig zu erkennen. Häufiger ist der abrupte Übergang von den Intermediärzellen zum Stratum corneum zu beobachten. In der Nachbarschaft vorhandener Läsionen ist der Interzellularraum häufig in direkter Nachbarschaft zu Desmosomen stark erweitert und zunächst mit einem feinkörnigen Material angefüllt. Im weiteren Verlauf des Interzellularspaltens erweitert dieser sich zunehmend, ohne eine scharfe Begrenzung zu den angrenzenden Zellen erkennen zu lassen.

5.5. Das Stratum corneum

Die im Semidünnschnitt erwähnte netzartige Auflockerung des Stratum corneum ist auch im Ultradünnschnitt zu erkennen. Man muss davon ausgehen, dass es dadurch bei der Prozessierung zum Abriss von Teilen der Hornschicht gekommen ist. Es ist daher schwierig zu beurteilen, wie viel des tatsächlichen Stratum corneum im Präparat erhalten geblieben ist. Auch kann nicht davon ausgegangen werden, dass die im TEM sichtbare Oberfläche der tatsächlichen epidermalen Oberfläche entspricht.

² vergl. cornified envelope: elektronendichte, intrazelluläre Proteinhülle der jungen Hornzelle

Die jungen Sebokorneozyten der ersten Reihen des Stratum corneum sind in ihren Ausmaßen und ihrer Größe mit vorhandenen Transitivzellen vergleichbar. Zur Oberfläche hin flachen sie noch etwas ab. Besonders bei Abwesenheit von Transitivzellen wird der sehr plötzliche Zelltod bzw. die ausgesprochen abrupte Verhornungsgrenze durch das plötzliche Fehlen jeglicher Organellen- oder Kernreste in den Hornzellen deutlich (Abb. 13a). Das Zellinnere ist mit stark kondensierten, homogenen, elektronendichten Hornschollen angefüllt. Diese sind durch optisch leere, spaltenförmige Zwischenräume unterschiedlicher Ausdehnung voneinander getrennt, die zur Oberfläche hin enger werden, aber niemals ganz verschwinden. Im Zentrum der jungen Hornzellen befinden sich überwiegend optisch leere, meist durch angrenzende Hornschollen begrenzte Fetteinlagerungen, die nach ca. vier Zellreihen plötzlich verschwinden. Bis in die mittleren Zelllagen sind frei zwischen den Hornschollen liegende Lamellenstapel zu identifizieren. Diese sind z. T. in eine inhomogene aber durchgängig elektronendichte Substanz eingebettet oder grenzen an vorhandene Fetteinlagerungen bzw. die optisch leeren Räume zwischen den Hornschollen (Abb. 12d). In den jungen Hornzellen kann ein deutliches, elektronendichtes marginales Band identifiziert werden, das durch die desmosomalen Zellkontakte unterbrochen wird (Abb. 13a). Der Interzellularraum ist im gesamten Stratum corneum deutlich zu erkennen. Im Bereich der zahlreichen Desmosomen erscheint sein feinstaubiger Inhalt dichter und elektronenundurchlässiger als in den extradesmosomalen Bereichen. Dort verliert die Interzellularsubstanz an Dichte und wird feinkörnig. Im Interzellularraum zwischen den jüngeren Hornzellen befinden sich regelmäßig optisch leere, kleinblasige Erweiterungen. In einem Präparat ist die epidermale Oberfläche anhand von direkt auflagernden Pflanzenresten identifiziert worden. In diesem Bereich kann deutlich dargestellt werden, dass die oberflächliche Desquamation von Hornzellen durch eine Separation im Interzellularraum zustande kommt: Die Erweiterungen der mit feinkörnigem Material angefüllten Interzellularräume der obersten Hornzelllagen vergrößern sich im weiteren horizontalen Verlauf des Interzellularspalt, wobei die Zellgrenzen der angrenzenden Hornzellen stets sichtbar bleiben. Schließlich kommt es zu einer Ablösung der Zelle im Interzellularspalt und damit zur Desquamation ganzer Hornzellen.

5.5.1. Erkennbare Abweichungen der beschriebenen Verhältnisse im Stratum corneum

In den Proben beider Alterstufen erscheint das Stratum corneum (trotz präparationsbedingter Abrisse) sehr hoch. Vereinzelt kommen im gesamten Stratum corneum, meist in direktem Anschluss an Desmosomen, große Erweiterungen des Interzellularraums vor. Diese ragen ohne scharfe Begrenzung in die angrenzenden Zellen hinein und sind mit einem fein- bis

grobkörnigen Material gefüllt. Auch Interzellularräume, die über längere Strecken erweitert und optisch leer sind, kommen vor. Dabei bleibt die Begrenzung zu den benachbarten Zellen deutlich sichtbar. Es kommen Proben vor, in denen die jungen Hornzellen noch Kernreste aufweisen. Selten können Fetteinlagerungen geringerer Ausdehnung auch in höheren Hornzelllagen auftreten. Dort kommt es häufig zu Zerreißen des Präparates. Innerhalb der ersten Zelllagen können freiliegende Lamellenstapel identifiziert werden.

In veränderten Hautbezirken und deren Umgebung ist bei zunehmendem Schweregrad der Veränderungen das Auftreten von lamellären Strukturen vermindert und ihre Struktur wird undeutlicher. Die Spalten zwischen den Hornschollen können ausgesprochen eng sein, so dass das Stratum corneum sehr kompakt erscheint (Abb. 14b). In solchen Bereichen ist der Interzellularraum schwer auszumachen, Lamellenstapel, zentrale Fetteinlagerungen und ein marginales Band fehlen. Häufig erscheinen die Hornschollen nicht homogen, sondern wolkig und es werden nicht vollständig kondensierte Keratinfilamentbündel gefunden.

In einigen Proben wird durch einen von der Oberfläche ausgehenden Spalt eine bakterielle Invasion des Stratum corneum beobachtet. Von diesem mit Zelldetritus und Bakterien locker gefüllten Spalt ziehen „Straßen“ mit einem schwammig-wolkigen Erscheinungsbild in das ihn umgebende noch intakte Stratum corneum hinein (Abb. 14b). Auch in den Proben der Tiere im Alter von 14 Wochen können solche wolkigen Areale mit zum Teil beträchtlicher Ausdehnung gefunden werden.

6. Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse

Aufgrund der Ergebnisse der Futteranalyse wird bei den 21 Wochen alten Tieren des Hauptversuchs auf die Analyse der epidermalen Fettsäuren verzichtet. Stattdessen werden die Tiere des Wiederholungsversuchs zur Fettsäureanalyse dieser Altersstufe herangezogen.

6.1. Der prozentuale Anteil freier Fette in der Haut der reticulate scales

Aus den im Vorversuch verwendeten Einzelproben der Haut der 6 Wochen alten Tiere werden anteilig in:

der Standardgruppe	17,31 %,
der doppelt biotindosierten Gruppe	16,97 %
und in der vierfach biotindosierten Gruppe	16,97 % Gesamtfett extrahiert.

Im Alter von 14 Wochen besteht die Haut anteilig in:

der Standardgruppe zu	16,57 %,
der doppelt biotindosierten Gruppe zu	15,55 %
und der vierfach biotindosierten Gruppe zu	16,70 % aus Fetten.

Die gepoolten Proben der 6 Wochen alten Tiere des Hauptversuchs enthalten im Durchschnitt anteilig in:

der Standardgruppe	16,60 %,
in der doppelt biotindosierten Gruppe	16,15 %
und der vierfach biotindosierten Gruppe	16,06 % Gesamtfett.

Nach 14 Wochen werden anteilig im Durchschnitt aus der Haut der gepoolten Proben der Tiere

der Standardgruppe	16,11 %,
der doppelt biotindosierten Gruppe	16,17 %
und der vierfach biotindosierten Gruppe	16,16 % Gesamtfett extrahiert.

Aus den gepoolten Proben der 21 Wochen alten Tiere des Wiederholungsversuchs werden durchschnittlich anteilig:

in der Standardgruppe	12,75 %,
und in der doppelt biotindosierten Gruppe	13,78 % Gesamtfett extrahiert.

6.2. Die Ergebnisse der Analyse der Nicht-Hydroxy (nonOH)-Fettsäuren

Es wurden 28 Nicht-Hydroxy-Fettsäuren (nonOH FS) nachgewiesen, die in der Summe aller Untersuchungstermine zusammengenommen, in einem Anteil >0,1 % vorhanden sind (Abb. 15a). Davon können 16 anhand der Standards identifiziert werden:

C14:0	Myristinsäure,
C16:0	Palmitinsäure,
C16:1	Palmitoleinsäure,
C17:0	Margarinsäure,
C18:0	Stearinsäure,
C18:1n-9	Ölsäure,
C18:2n-6	Linolsäure,
C18:3n-3	α – Linolensäure,
C20:0	Arachinsäure,
C20:1n-11	Gadoleinsäure,
C20:2n-6	Eicosa / Icosadiensäure (Anteil im Gesamtmittel <0,1 %),
C20:4n-6	Arachidonsäure,
C22:0	Behensäure,
C22:1n-11	Erucasäure,
C24:0	Lignocerinsäure,
C26:0	Cerotinsäure.

Die übrigen 12 Nicht-Hydroxy Fettsäuren(nonOH FS), die nicht anhand von Standards identifiziert werden können, sind:

nonOH FS 1 mit einer Kettenlänge zwischen C14:0 und C16:0,

nonOH FS 2 mit einer Kettenlänge zwischen C18:1n-9 und C18:2n-6,

nonOH FS 3 und nonOH FS 4 mit Kettenlängen zwischen C20:1n-9 und C20:2n-6,

nonOH FS 5 und nonOH FS 6 mit Kettenlängen zwischen C20:4n-6 und C22:0,

nonOH FS 7 mit einer Kettenlänge zwischen C22:0 und C22:1n-11,

nonOH FS 8, nonOH FS 9, nonOH FS 10 und nonOH FS 11 mit Kettenlängen zwischen C22:0 und C22:1n-11 und

nonOH FS 12 mit einer Kettenlänge zwischen C24:0 und C26:0.

In Anhang 4 Tabellen 1 bis 3 sind ihre minimalen, maximalen und mittleren Anteile pro Fütterungsgruppe nach steigender Kettenlänge zusammengefasst.

In den untersuchten Proben ist, unabhängig vom Alter der Tiere, der Fütterungsgruppe oder des Versuchsdurchlaufs, ein nur geringgradig abweichendes (s. u.), allgemeines Muster der nonOH-Fettsäuren zu erkennen. Bezüglich der Quantität der vorkommenden Fettsäuren in den Proben des Hauptversuchs wird folgendes allgemein gültige Schema deutlich:

C20:0 > C16:0 > C18:0 > C18:1n-9 > C22:0 > C16:1 > **C18:2n-6¹** > C14:0 > C20:1n-9 > C22:1n-11 > C26:0 > **C20:4n-6²** > C18:3n-3 > C24:0

¹Im Alter von 6 Wochen ist der Anteil von **C18:2n-6** (Linolsäure) in allen Proben höher als der Anteil von C14:0 (Myristinsäure). Im Alter von 14 Wochen liegt der Anteil von C18:2n-6 dagegen zwischen dem von C20:1n-9 (Gadoleinsäure) und C22:1n-11 (Erucasäure).

²Im Alter von 6 Wochen ist der Anteil von **C20:4n-6** (Arachidonsäure) in allen Proben höher als der Anteil von C18:3n-3 (α -Linolensäure). Im Alter von 14 Wochen liegt der Anteil von C20:4n-6 in der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe dagegen zwischen dem von C18:3n-3 und C24:0 (Lignocerinsäure). In der vierfach biotindosierten Gruppe ist C20:4n-6 anteilig am geringsten vorhanden (<C24:0).

Das Fettsäuremuster der Proben der 21 Wochen alten Tiere des Wiederholungsversuchs weicht geringgradig von dem oben aufgeführten Schema ab (Bereiche der Abweichungen unterstrichen):

C20:0 > C16:0 > C18:1n-9 > C18:0 > C22:0 > C16:1 > C18:2n-6 > C20:1n-9 > C14:0 > C22:1n-11 > C26:0 > C24:0 > C20:4n-6 > C18:3n-3

6.3. Die Ergebnisse der Analyse der Hydroxy (OH)-Fettsäuren

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der OH-Fettsäuren sind sehr uneinheitlich. Es bestehen zwischen den Fütterungsgruppen und Altersstufen sehr große Differenzen bezüglich der Anzahl der insgesamt nachgewiesenen Fettsäuren (Textabbildungen 9a und b). Die anhand der Standards identifizierten und in Anteilen >0,1 % der insgesamt nachgewiesenen Fettsäuren vorkommenden Hydroxy-Fettsäuren (OH FS) sind:

ω -(OH)-C16:0	ω -Hydroxy-Palmitinsäure,		
ω -(OH)-C18:0	ω -Hydroxy-Stearinsäure,	α -(OH)-C18:0	α -Hydroxy-Stearinsäure,
ω -(OH)-C20:0	ω -Hydroxy-Arachinsäure,	α -(OH)-C20:0	α -Hydroxy-Arachinsäure,
ω -(OH)-C22:0	ω -Hydroxy-Behensäure,	α -(OH)-C22:0	α -Hydroxy-Behensäure,
ω -(OH)-C24:0	ω -Hydroxy-Lignocerinsäure,		
ω -(OH)-C26:0	ω -Hydroxy-Cerotinsäure.		

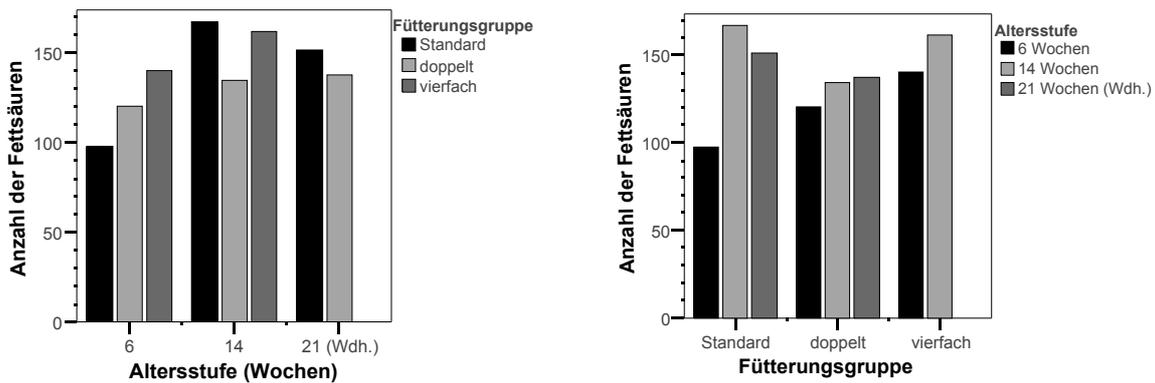
Darüber hinaus kommen weitere 59 unbekannte Hydroxy-Fettsäuren (OH FS) in Anteilen >0,1 % vor (OH FS 1 bis 59), die nicht durch die Standards identifiziert werden können. Aufgrund des nicht isothermalen gaschromatographischen Analyseverfahrens ist eine Berechnung der Kettenlängen dieser unbekannteten Fettsäuren nicht möglich. Allerdings haben sie ab OH FS 29 eine Kettenlänge >C26. In Anhang 4, Tabellen 4 bis 6, sind die minimalen, maximalen und mittleren Anteile der OH-Fettsäuren pro Fütterungsgruppe nach steigender Kettenlänge zusammengefasst.

Im Alter von 6 Wochen kann mit steigender Biotinsupplementierung eine erhöhte Anzahl an OH-Fettsäuren nachgewiesen werden. Diese Parallelität ist weder bei den 14 Wochen alten Tieren noch bei den 21 Wochen alten Tieren des Wiederholungsversuchs zu beobachten. Im Alter von 14 Wochen kommt es in allen Fütterungsgruppen zu einem Anstieg der Anzahl nachweisbarer OH-Fettsäuren, was in der Standardgruppe besonders deutlich und in der Gruppe der doppelt biotindosierten Tiere vergleichsweise schwach ausgeprägt ist.

Abbildung 9: Mittlere Anzahl nachgewiesener OH-Fettsäuren

a: Vergleich pro Fütterungsgruppe

b: Vergleich pro Altersstufe



Es kommt vor, dass in einer oder mehreren der vier pro Fütterungsgruppe untersuchten Proben bestimmte OH-Fettsäuren gar nicht nachzuweisen sind (Anhang 4, Tab.n 4 bis 6: N = Anzahl der Proben, in denen die jeweilige Fettsäure enthalten ist). In den Proben der 6 Wochen alten Tiere der Standardgruppe sind OH FS 25 und 34, in der Gruppe der doppelt biotindosierten Tiere ist OH FS 47 und in der Gruppe der vierfach biotindosierten Tiere ist OH FS 54 in keiner der Proben nachzuweisen.

7. Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Lipidanalyse

Die Normalverteilung der Daten wird vorausgesetzt, auf eine Prüfung wird aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

Die Streudiagramme in Anhang 4 (Abb. 1 bis 3: nonOH-Fettsäuren, und Abb. 4 und 5: OH-Fettsäuren) geben einen Überblick über die Verteilung der Fettsäuren pro Fütterungsgruppe bzw. Lebensalter. Zur besseren Darstellung werden die Daten je nach mittlerem prozentualen Anteil gruppiert und in den jeweiligen Diagrammen entsprechend unterschiedliche Maßstäbe (y-Achse) verwendet. Die Darstellung der OH-Fettsäuren beschränkt sich aufgrund ihrer hohen Anzahl auf die Fettsäuren mit einem mittleren prozentualen Anteil in der Probe von über 1 %.

7.1. Die Auswertung der Varianzanalyse (UNIANOVA)

7.1.1. Die Varianzanalyse der Nicht-Hydroxy Fettsäuren (nonOH FS)

Die Varianzanalyse der nonOH-Fettsäuren ergibt bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen, nicht jedoch bezüglich der unterschiedlichen Fütterungsgruppen, einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte der einzelnen Fettsäureanteile (Anhang 4, Tab. 7). Davon betroffen sind alle Fettsäuren mit Ausnahme der Palmitoleinsäure (C16:1) und α -Linolensäure (C18:3n-3) sowie der nicht identifizierten Fettsäuren nonOH FS 1, 2, 4, 7, 9 und 11.

Bei der im Rahmen der Varianzanalyse automatisch durchgeführten Kreuzreaktion der beiden unabhängigen Variablen (Alterstufe und Fütterungsgruppe) ergibt sich für die nonOH FS 5 mit $p < 0,0001$ ein signifikantes Ergebnis (Tab. 11). Dies weist auf das Vorhandensein einer Wechselwirkung zwischen den Faktoren Altersstufe und Fütterungsgruppe hin, was einen Widerspruch zur sachlich begründeten Unabhängigkeit beider Faktoren darstellt.

Tabelle 11: Auszug Varianzanalyse (Kreuzreaktion)

Altersstufe * Fütterungsgruppe	
Abhängige Variable	Signifikanz
nonOH FS 5	<0,0001

Wegen dieses Widerspruchs werden die Daten dieser Fettsäure nach Altersstufen und Fütterungsgruppen aufgeteilt und erneut einer Varianzanalyse unterzogen (Tab. 12). In allen Fütterungsgruppen besteht ein altersabhängiger signifikanter Unterschied des Anteils der nonOH FS 5, im Alter von 6 und 21 Wochen besteht zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Einfluss des Tialters sowie der Fütterungsgruppen auf den Anteil dieser Fettsäure besteht.

Tabelle 12: Varianzanalyse der aufgeteilten Daten (Signifikanzniveau: 0,05)

Abhängige	Altersstufe		Fütterungsgruppe	
	Fütterungsgruppe	Signifikanz	Altersstufe	Signifikanz
nonOH FS 5	Standard	<0,0001	6 Wochen	0,009
	doppelt	<0,0001	14 Wochen	n. s. ¹
	vierfach	<0,0001	21 Wochen (Wdh.)	0,001

¹ nicht signifikant (Signifikanzniveau: 0,05)

7.1.2. Die Varianzanalyse der Hydroxy-Fettsäuren (OH FS)

Die Varianzanalyse der Hydroxy-Fettsäuren ergibt bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen bei einem Signifikanzniveau von 0,05 nur bei der Hälfte der nachgewiesenen Fettsäuren einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte (Anhang 4, Tab. 8). Bezüglich der

unterschiedlichen Fütterungsgruppen besteht für OH FS 3, 12, 24, 25, 58 und α -C22:0 ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen mittleren Anteilen (Anhang 4, Tab. 8).

Bei der im Rahmen der Varianzanalyse durchgeführten Kreuzreaktion der beiden unabhängigen Variablen (Alterstufe und Fütterungsgruppe) ergibt sich für α -C22:0, OH FS 24 und 58 jeweils ein signifikantes Ergebnis (Tab. 13).

Tabelle 13: Auszug Varianzanalyse (Kreuzreaktion)

Fütterungsgruppe * Altersstufe	
Abhängige Variable	Signifikanz
α -C22:0	0,009
OH FS 24	0,03
OH FS 58	<0,0001

Dies stellt eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Altersstufe und Fütterungsgruppe dar, was im Widerspruch zur sachlich begründeten Unabhängigkeit beider Faktoren steht. Wegen dieser Widersprüche werden die Daten dieser Fettsäuren nach Fütterungsgruppen und Altersstufen aufgeteilt und erneut einer Varianzanalyse unterzogen (Tab. 14).

Tabelle 14: Varianzanalyse der nach Fütterungsgruppe bzw. Alterstufe aufgeteilten Daten (Signifikanzniveau: 0,05)

Abhängige	Altersstufe		Fütterungsgruppe	
	Fütterungsgruppe	Signifikanz	Altersstufe	Signifikanz
α -C22:0	Standard	n. s. ¹	6 Wochen	0,033
	doppelt	n. s. ¹	14 Wochen	n. s. ¹
	vierfach	0,017	21 Wochen (Wdh.)	n. s. ¹
OH FS 24	Standard	0,001	6 Wochen	n. s. ¹
	Doppelt	n. s. ¹	14 Wochen	0,013
	vierfach	n. s. ¹	21 Wochen (Wdh.)	n. s. ¹
OH FS 58	Standard	0,001	6 Wochen	- ²
	doppelt	n. s. ¹	14 Wochen	0,005
	vierfach	0,037	21 Wochen (Wdh.)	n. s. ¹

¹ nicht signifikant

² nur in zwei der insgesamt 12 Proben dieser Altersstufe nachzuweisen

Für die Anteile von α -C22:0 kommt es in der vierfach biotindosierten Gruppe, für die Anteile von OH FS 24 in der Standardgruppe und für OH FS 58 in der Standard- und vierfach biotindosierten Gruppe zu einem altersabhängigen signifikanten Unterschied. Im Alter von 6 Wochen besteht für den Anteil von α -C22:0 und nach 14 Wochen für die Anteile von OH FS 24 und 58 zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen. Nach 6 Wochen wird die OH FS 58 nur in zwei der 12 Proben nachgewiesen, weswegen für diese Altersstufe keine Varianzanalyse durchgeführt wird.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Anteil von α -C22:0 in der vierfach biotindosierten Gruppe, die Anteile von OH FS 24 in der Standardgruppe und die Anteile von OH FS 58 in der Standard- und vierfach biotindosierten Gruppe einem Alterseinfluss unterliegen. Darüber hinaus wird vermutlich der Anteil von α -C22:0 nach 6 Wochen durch die unterschiedlichen Biotinzusätze beeinflusst, die OH FS 24 und 58 nach 14 Wochen.

7.2. Der quantitative und paarweise Mehrfachvergleich der mittleren Fettsäureanteile

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und durch Betrachtung der Streudiagramme (Anhang 4, Abb. 1 bis 5) wird eine Inhomogenität der Datenverteilung angenommen. Daher wird beim Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Test nach Tamhane T2 angewendet, bei dem das Signifikanzniveau auf 0,017 korrigiert wird. Die Auswertung von nonOH FS 5 wird aufgrund des oben dargestellten Widerspruchs (Kapitel 7.1.1) nach Fütterungsgruppen und Altersstufen getrennt durchgeführt.

7.2.1. Die Nicht-Hydroxy-Fettsäuren (nonOH FS)

7.2.1.1. Der Vergleich der Nicht-Hydroxy-Fettsäuren pro Altersstufe

Auf einen quantitativen Vergleich der epidermalen nonOH-Fettsäureanteile in den unterschiedlichen Fütterungsgruppe wird, mit Ausnahme der nonOH FS 5, verzichtet, da statistisch kein Einfluss nachweisbar ist (Anhang 4, Tab. 7). Der quantitative Vergleich der mittleren Anteile der nachgewiesenen Fettsäuren wird anhand von Differenzberechnungen im Rahmen des Mehrfachvergleichs (Anhang 4, Tab.n 9 und 10) hergestellt und ist in Tabelle 15 zusammengefasst. Es werden auch die Fettsäuren berücksichtigt, bei denen die Anteile anhand der Varianzanalyse nicht signifikant unterschiedlich (n. s.) sind. In Anhang 4, Tabelle 9 sind die Ergebnisse des Mehrfachvergleichs der nonOH-Fettsäuren mit signifikanten Unterschieden zwischen den Altersstufen im Einzelnen und in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt.

Der Anteil von C16:0, C18:0 sowie nonOH FS 1 und 7 nimmt mit zunehmendem Alter stetig ab. Dabei ist der Unterschied für C16:0 zwischen 6 und 21 Wochen und für C18:0 zwischen allen Altersstufen signifikant. Die Fettsäuren C18:2n-6, C20:2n-6, C20:4n-6 und nonOH FS 2 haben im Alter von 6 Wochen den höchsten Anteil und sind nach 14 Wochen anteilig besonders schwach vertreten. Zwischen 6 und 14 sowie 14 und 21 Wochen bestehen dabei für C18:2n-6 signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Anteilen, für C20:2n-6, C20:4n-6 sind die Unterschiede zwischen 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen signifikant.

Tabelle 15: Übersicht über den quantitativen Vergleich der Fettsäureanteile pro Altersstufe¹

Quantitativer Ver-	Fettsäure
6 > 14 > 21 Wochen	C16:0; C18:0; nonOH FS 1, 7 (n. s. ²)
6 > 21 > 14 Wochen	C18:2n-6; C20:2n-6; C20:4n-6; nonOH FS 2 (n. s. ²)
14 > 6 > 21 Wochen	C20:0; C18:3n-3 (n. s. ²)
14 > 21 > 6 Wochen	C14:0
21 > 6 > 14 Wochen	nonOH FS 4, 9, 11 (n. s. ²)
21 > 14 > 6 Wochen	C18:1n-9; C20:1n-9; C22:0; C22:1n-11; C24:0; C16 :1 (n. s. ²);

¹ nonOH FS 5 wird nach Fütterungsgruppen getrennt bewertet (Kapitel 7.2.1.2.)

² n. s. : (nicht signifikant) kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen (nach UNIANOVA)

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse des Mehrfachvergleichs

Signifikante Unterschiede bestehen zwischen:	6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen	6 und 14 sowie 14 und 21 Wochen	6 und 21 sowie 14 und 21 Wochen	6 und 21 Wochen	6 und 14, 6 und 21, sowie 14 und 21 Wochen
für den mittleren Anteil der Fettsäure:	C20:2n-6 C20:4n-6 nonOH FS 6 C22:0 nonOH FS 10 nonOH FS 5 ¹	C14:0 C18:2n-6	C18:1n-9 C20:1n-9 C24:0 nonOH FS 12	C16:0 nonOH FS 8	C18:0 C20:0 nonOH FS 3 C22:1n-11

¹ in der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe

C20:0 und C18:3n-3 zeigen ihren höchsten mittleren Anteil nach 14 Wochen und sind nach 6 Wochen anteilig stärker nachweisbar als nach 21 Wochen, wobei die Unterschiede für C20:0 zwischen allen Altersstufen signifikant sind.

Der Anteil von C14:0 ist nach 14 Wochen besonders hoch und nach 21 Wochen höher als nach 6 Wochen. Signifikante Unterschiede bestehen dabei zwischen 6 und 14 sowie 14 und 21 Wochen.

Der höchste Anteil von nonOH FS 4, 9, 11 wird im Alter von 21 Wochen erreicht, der geringste Anteil ist nach 14 Wochen nachweisbar.

Mit zunehmendem Alter können C18:1n-9, C20:1n-9, C22:0, C22:1n-11, C24:0, nonOH FS 3, 6, 8, 10, 12 sowie C16:1, C26:0 in stetig höheren Anteilen nachgewiesen werden.

Für die Anteile von C22:0 und nonOH FS 6 und 10 bestehen zwischen 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen und für C18:1n-9, C20:1n-9, C24:0 und nonOH FS 12 zwischen 6 und 21 sowie 14 und 21 Wochen signifikante Unterschiede. Die mittleren Anteile von nonOH FS 8 sind zwischen 6 und 21 Wochen signifikant unterschiedlich. Für die mittleren Anteile von C22:1n-11 und nonOH FS 3 bestehen zwischen allen Altersstufen signifikante Unterschiede.

7.2.1.2. Der quantitative und paarweise Vergleich von nonOH FS 5 pro Altersstufe und Fütterungsgruppe

Für nonOH FS 5 werden die Daten aufgrund des Widerspruchs bei der Kreuzreaktion (siehe Kapitel 7.1.1.) vor der weiteren Auswertung nach Fütterungsgruppen und Altersstufen aufgeteilt. Der quantitative Vergleich der mittleren Anteile von nonOH FS 5 wird anhand von Differenzberechnungen im Rahmen des Mehrfachvergleichs (Anhang 4, Tab. 11 und 12) hergestellt. Da die vierfach biotindosierte Gruppe nur in zwei Altersstufen eingesetzt wurde, werden die Daten zum quantitativen Vergleich aus den Tabellen 1 bis 3, Anhang 4 berechnet.

Vergleich der Altersstufen:

Für alle Fütterungsgruppen wird ein Einfluss der unterschiedlichen Altersstufen auf den Anteil von nonOH FS 5 festgestellt (Tab. 12, Kapitel 7.1.1.). In der Standardgruppe ist diese Fettsäure mit zunehmendem Alter in stetig höheren Anteilen vorhanden ($21 > 14 > 6$). In der doppelt biotindosierten Gruppe ist der Anteil mit 14 Wochen höher als mit 21 Wochen und mit 21 Wochen höher als mit 6 Wochen ($14 > 21 > 6$). In beiden Fütterungsgruppen besteht zwischen 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied. Mit statistisch signifikantem Unterschied ist der mittlere Anteil von nonOH FS 5 in der vierfach biotindosierten Gruppe mit zunehmendem Alter größer.

Vergleich der Fütterungsgruppen:

Mittels Varianzanalyse wird für die Altersstufen 6 und 21 Wochen ein signifikanter Unterschied der mittleren Anteile von nonOH FS 5 in den unterschiedlichen Fütterungsgruppen nachgewiesen (Tab. 12, Kapitel 7.1.1.). Mit 6 und 14 Wochen ist der Anteil von nonOH FS 5 in der doppelt biotindosierten Gruppe am höchsten und in der Standardgruppe am niedrigsten ($2x > 4x > S$). Im Mehrfachvergleich kann dabei trotz der Ergebnisse der Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Bei den 21 Wochen alten Tieren des Wiederholungsversuchs ist der Anteil von nonOH FS 5, bei signifikantem Unterschied, in der Standardgruppe höher als in der doppelt biotindosierten Gruppe ($S > 2x$).

7.2.2. Die Hydroxy-Fettsäuren (OH FS)

7.2.2.1. Der Vergleich der Hydroxy-Fettsäuren pro Altersstufe

Die Ergebnisse des quantitativen Vergleichs der mittleren Anteile der OH-Fettsäuren bezüglich der unterschiedlichen Altersstufen werden anhand von Differenzberechnungen im Rahmen des Mehrfachvergleichs erhoben (Anhang 4, Tab. 13 und 14) und sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Übersicht über den quantitativen Vergleich der Fettsäureanteile pro Altersstufe¹

Quantitativer Vergleich der Altersstufen	Fettsäure
6 > 14 > 21 Wochen	α-C18:0 OH FS 2, 6, 8, 9, 12, 32, 33, 35, 43, 45, 53, 56 OH FS 5, 28, 39, 44, 46, 47, 48 (n. s. ²)
6 > 21 > 14 Wochen	ω-C18:0 (n. s. ²), ω-C20:0 (n. s. ²) OH FS 3, 31 OH FS 1, 4, 7, 10, 13, 18 (n. s. ²)
14 > 6 > 21 Wochen	OH FS 36, 41 (n. s. ²)
14 > 21 > 6 Wochen	α-C20:0 (n. s. ²) OH FS 11, 25, 30 OH FS 17 (n. s. ²)
21 > 6 > 14 Wochen	ω-C16:0 (n. s. ²), ω-C22:0 (n. s. ²) OH FS 15, 27, 38, 50 (n. s. [*])
21 > 14 > 6 Wochen	ω-C26:0, ω-C24:0 (n. s. ²), OH FS 20, 22, 23, 29, 40, 42, 51, 52, 54, 55, 57 OH FS 14, 16, 19, 21, 34, 37, 49, 59 (n. s. ²)

¹ α-C22:0, OH FS 24 und 58 werden nach Altersstufen getrennt beurteilt (Kapitel 7.2.2.3.)

² n. s.: (nicht signifikant) kein signifikanter Unterschied zwischen den Alterstufen (nach UNIANOVA)

Tabelle 18: Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse des Mehrfachvergleichs bei signifikantem Einfluss der Altersstufen

Signifikante Unterschiede bestehen zwischen:	6 und 14 Wochen	6 und 21 Wochen	14 und 21 Wochen	6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen	6 und 21 sowie 14 und 21 Wochen	6 und 14, 6 und 21, sowie 14 und 21 Wochen
für den mittleren Anteil der Fettsäure:	OH FS 3 OH FS 11 OH FS 24 ¹ OH FS 25 OH FS 30 OH FS 31 OH FS 43	OH FS 51 OH FS 54	α-C18 :0	OH FS 23 ω-C26:0 OH FS 57	OH FS 6 OH FS 33 OH FS 53	OH FS 29 OH FS 32 OH FS 35 OH FS 45 OH FS 55 OH FS 56

¹ in der Standardgruppe

Es werden auch die Fettsäuren berücksichtigt, bei denen die Anteile anhand der Varianzanalyse nicht signifikant unterschiedlich (n. s.) sind. In Anhang 4, Tabelle 13 sind die Ergebnisse des Mehrfachvergleichs der OH-Fettsäuren mit signifikanten Unterschieden zwischen den Altersstufen im Einzelnen und in Tabelle 18 zusammenfassend dargestellt.

Mit zunehmendem Alter werden abnehmende mittlere Anteile von α -C18:0 sowie den nicht eindeutig identifizierten Fettsäuren OH FS 2, 5, 6, 8, 9, 12, 28, 32, 33, 35, 39, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 53 und 56 nachgewiesen. Dabei besteht für α -C18:0 zwischen 14 und 21 Wochen ein signifikanter Unterschied. Für OH FS 43 ist zwischen 6 und 14 Wochen ein signifikanter Unterschied der mittleren Anteile nachzuweisen und für OH FS 6, 33 und 53 zwischen 6 und 21 sowie 14 und 21 Wochen. Die Anteile von OH FS 32, 35, 45 und 56 sind zwischen allen Altersstufen signifikant unterschiedlich. Für OH FS 2, 8, 9 und 12 kann im Mehrfachvergleich, trotz signifikantem Ergebnis in der Varianzanalyse, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Fettsäuren ω -C18:0, ω -C20:0 sowie OH FS 1, 3, 4, 7, 10, 13, 18 und 31 zeigten den höchsten mittleren Anteil nach 6 Wochen und den niedrigsten nach 14 Wochen, wobei der Unterschied für OH FS 3 und 31 zwischen 6 und 14 Wochen signifikant ist.

Mit 14 Wochen wird der höchste mittlere Anteil von OH FS 36 und 41 nachgewiesen, mit 21 Wochen der niedrigste. Für α -C20:0 und OH FS 11, 17, 25 und 30 wird nach 14 Wochen der höchste mittlere Anteil nachgewiesen, nach 6 Wochen der niedrigste, bei OH FS 11, 25 und 30 mit einem signifikanten Unterschied zwischen 6 und 21 Wochen.

Nach 21 Wochen wird der höchste und nach 14 Wochen der niedrigste Anteil von ω -C16:0 und ω -C22:0 sowie OH FS 15, 27, 38 und 50 nachgewiesen.

Der mittlere Anteil von ω -C26:0 und ω -C24:0 sowie OH FS 14, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 34, 37, 40, 42, 49, 51, 52, 54, 55, 57 und 59 nimmt mit zunehmendem Alter stetig zu. Bei ω -C26:0 sowie OH FS 23 und 57 besteht zwischen 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen ein signifikanter Unterschied, bei OH FS 51 und 54, zwischen 6 und 21 Wochen. Der mittlere Anteil OH FS 29 und 55 ist in allen Altersstufen signifikant unterschiedlich. Für OH FS 20, 22, 40, 42 und 52 kann im Mehrfachvergleich zwischen den Altersstufen trotz signifikantem Ergebnis in der Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

7.2.2.2. Der Vergleich der Hydroxy-Fettsäuren pro Fütterungsgruppe

Der quantitative Vergleich der mittleren OH-Fettsäureanteile unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Fütterungsgruppen wird an den diesbezüglich signifikant unterschiedlichen Fettsäuren durchgeführt. Die Daten der in Tabelle 19 übersichtlich dargestellten Ergebnisse werden anhand von Differenzberechnungen im Rahmen des Mehrfachvergleichs erhoben (Anhang 4, Tab. 15).

Tabelle 19: Übersicht über den quantitativen Vergleich der Fettsäureanteile mit signifikantem Unterschied pro Fütterungsgruppe¹

Quantitativer Vergleich der Fütterungsgruppe	Fettsäure
S > 2x > 4x	OH FS 12
S > 4x > 2x	OH FS 25
4x > 2x > S	OH FS 3

¹ α -C22:0, OH FS 24 und 58 werden nach Altersstufen getrennt bewertet (Kapitel 7.2.2.3.)

S: Standard, 2x: doppelte, 4x: vierfache Biotindosierung

Mit steigender Biotindosierung nimmt der mittlere Anteil von OH FS 12 in den Proben ab, der von OH FS 3 nimmt zu. Der mittlere Anteil von OH FS 25 ist in der Standardgruppe am höchsten und in der doppelt biotindosierten Gruppe am niedrigsten. Trotz signifikantem Ergebnis in der Varianzanalyse kann im Mehrfachvergleich kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

7.2.2.3. Der quantitative und paarweise Vergleich von α -C22:0, OH FS 24 und OH FS 58

Für α -C22:0, OH FS 24 und OH FS 58 werden die Daten aufgrund des Widerspruchs bei der Kreuzreaktion (Kapitel 7.1.2.) vor der weiteren Auswertung nach Fütterungsgruppen und Altersstufen aufgeteilt. Der quantitative Vergleich dieser Fettsäuren wird anhand von Differenzberechnungen im Rahmen des Mehrfachvergleichs (Anhang 4, Tab. 16 und 17) hergestellt. Da die vierfach biotindosierte Gruppe nur in zwei Altersstufen eingesetzt wurde, werden die Daten zum quantitativen Vergleich aus den Tabellen 4 bis 6, Anhang 4 berechnet.

Vergleich der Altersstufen:

Wie der Tabelle 14 (Kapitel 7.1.2.) zu entnehmen ist, kann für α -C22:0 in der vierfach biotindosierten Gruppe und für OH FS 24 und 58 in der Standard- und vierfach biotindosierten Gruppe ein Einfluss der Altersstufen festgestellt werden.

Der mittlere Anteil von α -C22:0 ist in der Standardgruppe mit 6 Wochen am höchsten und mit 14 Wochen am niedrigsten (6>21>14), in der doppelt biotindosierten Gruppe mit 14 Wochen am höchsten und mit 6 Wochen am niedrigsten (14>21>6). In der vierfach biotindosierten Gruppe ist α -C22:0 mit signifikantem Unterschied nach 14 Wochen mit einem höheren Anteil vertreten als nach 6 Wochen (14>6).

Der mittlere Anteil von OH FS 24 ist in der Standardgruppe nach 14 Wochen am höchsten und nach 6 Wochen am niedrigsten (14>21>6), wobei der Unterschied zwischen 6 und 14 Wochen signifikant ist. In der doppelt biotindosierten Gruppe ist der Anteil nach 6 Wochen am höchsten und nach 14 Wochen am niedrigsten (6>21>14). In der vierfach biotindosierten Gruppe nimmt der mittlere Anteil von OH FS 24 mit zunehmendem Alter ab (6>14).

Da OH FS 58 nach 6 Wochen in allen Fütterungsgruppen nur in jeweils einer Probe vorkam, wird auf den Vergleich von 6 und 14 sowie 6 und 21 Wochen verzichtet. Dies trifft trotz des signifikanten Ergebnisses auch auf den Vergleich innerhalb der vierfach biotindosierten Gruppe zu. In der Standard- und doppelt biotindosierten Gruppe ist der mittlere Anteil von OH FS 58 nach 14 Wochen höher als nach 21 Wochen (14>21), in der Standardgruppe mit signifikantem Unterschied.

Vergleich der Fütterungsgruppen:

Mittels Varianzanalyse wird für α -C22:0 nach 6 Wochen und für OH FS 24 und 58 nach 14 Wochen ein signifikanter Einfluss der Fütterungsgruppen festgestellt.

Der mittlere Anteil von α -C22:0 ist nach 6 Wochen in der Standardgruppe am höchsten und in der doppelt biotindosierten Gruppe am niedrigsten ($S > 4x > 2x$). Nach 14 Wochen ist dessen Anteil in der doppelt biotindosierten Gruppe am höchsten und in der Standardgruppe am niedrigsten ($2x > 4x > S$). Nach 21 Wochen sinkt der mittlere Anteil von α -C22:0 mit steigender Biotindosierung ab.

Nach 6 Wochen kommt es mit steigender Biotindosierung in der vierfach biotindosierten Gruppe zu einem Anstieg des mittleren Anteils von OH FS 24 ($4x > 2x > S$). Nach 14 Wochen ist dessen Anteil in der Standardgruppe am höchsten und in der doppelt biotindosierten Gruppe am niedrigsten ($S > 4x > 2x$). Nach 21 Wochen steigt der Anteil mit zunehmender Biotindosierung an ($2x > S$).

Für OH FS 58 ergibt sich erneut die Einschränkung des zu geringen Stichprobenumfangs nach 6 Wochen. Nach 14 Wochen ist dessen Anteil in der Standardgruppe am höchsten und in der doppelt biotindosierten Gruppe am niedrigsten ($S > 4x > 2x$), wobei zwischen Standard- und doppelt biotindosierter Gruppe ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden kann.

8. Die Ergebnisse der Klassifizierung der freien, epidermalen Lipide der reticulate scales

In jeder der exemplarisch untersuchten Proben sind Phospholipide, Ceramide, Triacylglyceride, Cholesterin und Cholesterinester nachzuweisen, die anhand der mitgeführten Standards identifiziert werden können.

Bei der Quantifizierung der klassifizierten Lipide übersteigt die Summe der jeweiligen Anteile das ursprünglich eingesetzte Probenvolumen. Mit größter Wahrscheinlichkeit ist dies auf eine prozessierungsbedingte Verunreinigung mit Kieselgel zurückzuführen, wodurch eine Bewertung dieser Ergebnisse nicht möglich ist. Unter Annahme einer gleichwertigen Verunreinigung der Proben können folgende Aussagen getroffen werden: Der größte Anteil wird in fünf der acht Proben von Cholesterinestern gebildet. Bei der Hälfte der Proben wird dieselbe

Reihenfolge der quantitativen Anteile ermittelt (Cholesterinester > Ceramide > TAGs > Phospholipide).

9. Die Ergebnisse der Analyse der Nicht-Hydroxy-Fettsäuren der klassifizierten Lipide

Durch die vorangegangene Klassifizierung und Prozessierung der Proben sind zum Teil so große Substanzverluste entstanden, dass die Konzentration des zu analysierenden Endprodukts keine auswertbaren Ergebnisse der gaschromatographischen Fettsäureanalyse zuließ. Soweit auswertbar, kommen übereinstimmend in allen Proben die in Tabelle 20 dargestellten nonOH-Fettsäuren in den jeweiligen Lipidklassen vor.

Tabelle 20: nonOH-Fettsäuren der klassifizierten Lipide

Phospholipide	Ceramide	Cholesterinester	TAGs
C16:0	C16:0	C16:0	C16:0
C16:1	C18:0	C18:0	C18:0
C18:0	C20:0	C20:0	C20:0
C20:0	C22:0	C22:0	C22:0
C22:0			C24:0
C22:1n-9			

Beim Vergleich des Fettsäuremusters der untersuchten Cholesterinester kommt es zu geringgradigen Unterschieden zwischen den verschiedenen Proben. Dabei werden je nach Probe auch C18:1n-9, C18:2n-6 und C20:4n-6 nachgewiesen. Das Fettsäuremuster der TAGs ist je nach untersuchter Probe sehr unterschiedlich. Abgesehen von den in Tabelle 20 stets vorkommenden Fettsäuren sind hier je nach Probe zusätzlich C17:0, C18:1n-9, C18:2n-6, C20:1n-9, C20:2n-6, C20:4n-6, C22:1n-11 und C26:0 nachzuweisen.