

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial standen Vordergliedmaßen von achtundzwanzig adulten Warmblutpferden zur Verfügung. Die Hufe stammten von Pferden, die in der Ross-Schlächtereier M. Walther - GmbH geschlachtet wurden und laut Angaben der Fleischer ein Alter zwischen vier und achtzehn Jahren aufwiesen. Die Rasse, das Geschlecht, der Verwendungszweck sowie die Haltungsform der Tiere ließen sich jedoch nicht mehr ermitteln. Es wurden nur Hufe untersucht, die regelmäßig geformt waren und adspektorisch keine Erkrankungen aufwiesen. Sofort nach der Schlachtung erfolgte die Absetzung der Vordergliedmaßen im Karpalgelenk. Einige Hufe wurden wenige Stunden bei 4 °C gelagert und dann weiterverarbeitet. Der überwiegende Teil wurde jedoch bei - 22 °C tiefgefroren, um postmortale Veränderungen des Gewebes durch längere Lagerung zu minimieren.

2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

2.1 Probengewinnung und Herstellung histologischer Präparate

Die Proben für die histologische Untersuchung stammten von fünfzehn verschiedenen Pferden. Mittels einer Tischbandsäge erfolgte die Gewinnung einer ca. 1 cm breiten Scheibe aus dem Zehnrückenteil, indem ca. 5 mm beidseits der Medianen ein Saggitalschnitt durch den gesamten Huf durchgeführt wurde. Anschließend wurden diese Scheiben durch Horizontal- und Saggitalschnitte in mehrere 1 x 1 x 1 cm breite Hornproben zerlegt. Auf diese Weise wurde Untersuchungsmaterial aus dem Kronhorn gewonnen, dessen Probenentnahmestellen 1 cm unter dem Kronrand, in der Mitte des Zehnrückenteils und 1 cm über dem Tragrand, etwa auf der Höhe der Hufbeinspitze, lagen (Abb. 1).

Es wurden sowohl Proben gewonnen, die nur die Epidermis umfassten, als auch solche, die auch die Lederhaut enthielten.

Durch die genaue Kenntnis des Tötungstermines und Auswertung der Literatur über die Hornbildungsrate im Kronhorn des Pferdes konnte der ungefähre Zeitpunkt der Hornbildung der jeweiligen entnommenen Probe errechnet werden. Es wurde eine Hornbildungsrate von ca. 7-9 mm/28 Tage zugrunde gelegt (LEU, 1987; JOSSECK et al., 1995). Auf diese Weise wurden Proben erhalten, die in unterschiedlichen Jahreszeiten gebildet wurden.

a) Herstellung von Nativschnitten

Hufproben, die nur die Epidermis umfassten, wurden ohne vorherige Fixation mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers auf Holzblöckchen aufgeklebt und nach deren Aushärtung nativ an einem automatischen Schlittenmikrotom der Firma Reichert-Jung mit Hilfe eines D - Messers geschnitten. Je nach Ausrichtung der Hornprobe wurden sowohl horizontale Schnitte als auch sagittale Schnitte mit einer Dicke von ca. 5 µm vorgenommen und kurzzeitig in ein Auffanggefäß mit Aqua dest. verbracht.

b) Herstellung von Gefrierschnitten

Um eine Fettfärbung mit Sudanschwarz B durchzuführen, wurden unfixierte Hufproben, die auch die Lederhaut und die lebende Epidermis umfassten, bei - 22 °C gefriergeschnitten. Mittels eines Gefrierklebers wurden sie sagittal auf den Objektisch geklebt, so dass mit einem D - Messer 5 µm dicke Schnitte abgenommen werden konnten, die anschließend in einem Auffanggefäß mit Aqua dest. gestreckt wurden. Eine Färbung der Schnitte erfolgte unmittelbar nach deren Herstellung oder nach der Aufbewahrung auf Objektträgern bei -18 °C.

c) Einbettung in Kunststoff

Zur Herstellung von Schnitten, die neben der verhornten Epidermis auch lebende Anteile sowie die Lederhaut enthielten, wurden die Proben in Hydroxyäthylmethacrylat (Technovit 7100, Fa. Kulzer) eingebettet, nachdem eine vorherige Fixierung in 4 %iger Paraformaldehydlösung für 8 Stunden und anschließender Spülung in 30 %iger Saccharoselösung stattfand. Das Aufkleben der Kunststoffblöckchen auf einem Histobloc-Träger erfolgte mittels Technovit 3040. Die Einbettung wurde so vorgenommen, dass sowohl saggitale als auch horizontale Schnittebenen resultierten.

Die Gewinnung von 5 µm dicken Schnitten erfolgte an einem automatischen Schlittenmikrotom der Firma Reichert-Jung unter Zuhilfenahme eines D-Messers. Nachdem sie in einem Wasserbad mit destilliertem Wasser aufgefangen und auf einen Objektträger aufgezoogen wurden, wurden sie entweder sofort gefärbt oder kurze Zeit bei Zimmertemperatur in einer geschlossenen Verpackung aufbewahrt.

d) Einbettung in Paraffin

Einige Proben, die sowohl Epidermis- als auch Lederhautanteile enthielten, wurden nach vorheriger Entwässerung in Alkohol in Paraffin eingebettet und auf Holzblöcke aufgeklebt. Um ein besseres Eindringen des Paraffins zu ermöglichen, wurden die Proben aus dem Kronhorn im Längsverlauf der Röhrchen in zwei Hälften geteilt, so dass man solche erhielt, die das innere Kronhorn umfassten und solche, die das mittlere und äußere Kronhorn umfassten.

Die 5 µm dicken Schnitte wurden an einem Tetrander der Firma Reichert-Jung mit Hilfe eines D-Messers gewonnen, in destilliertem Wasser gestreckt, auf Objektträger aufgezoogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Eine Verarbeitung erfolgte entweder unmittelbar oder nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur in einem geschlossenen Gefäß.

2.2 Histologische Übersichtsfärbungen

a) H.-E.-Färbung nach Kulzer (1985)

Diese Färbung ermöglichte eine Unterscheidung der Epidermis von der Lederhaut sowie der verhornten von der unverhornten Epidermis. Hierbei erfolgte eine Blaufärbung der Zellkerne durch das Hämalaun und eine Rotfärbung des Zytoplasmas durch das Eosin.

b) Methylenblau-Azur nach Richardson (Romeis, 1989)

Diese Färbung wurde an Semidünnschnitten zur Orientierung durchgeführt. Die beiden Stammlösungen (1% Methylenblau und 1%ige Azurlösung) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit Aqua dest. verdünnt. Basophile und osmiophile Strukturen stellen sich durch Methylenblau blau, metachromatische Strukturen rotviolett dar.

2.3 Histochemische Untersuchungen

a) Perjodsäure-Schiff-Reaktion nach Mc Manus (PAS-Reaktion)

Mit Hilfe dieser Färbemethode (KULZER, 1985) konnte ein semiquantitativer Nachweis von Glykoproteinen und Glykolipiden sowie Glykogen erfolgen. Als Kerngegenfärbung zur Differenzierung der lebenden und der verhornten Epidermis wurde der Farbstoff Hämalaun verwendet (ROMEIS, 1989).

PAS-positive Strukturen stellen sich je nach Reaktionsintensität leuchtend rot bis schwach rosa dar, PAS-negative Strukturen bleiben dagegen farblos.

b) PAS-Reaktion nach Diastaseinkubation (KULZER, 1985)

Für den Nachweis von Glykogen wurden die Schnitte 2 Stunden bei 37 °C in 2 %iger Diastaselösung inkubiert und anschließend der PAS-Färbung unterzogen. Im Gegensatz zu Glykoproteinen und Glykolipiden verhalten sich Glykogene diastaselabil, sie werden also nicht angefärbt.

c) Färbung mit Sudanschwarz B (Romeis, 1989)

Diese Färbung diente dem Nachweis von Lipiden innerhalb der Zelle und im Interzellularkitt. Bei einer starken Reaktion war eine schwarzgraue Färbung, bei einer schwachen eine hellgraue erkennbar.

d) Rhodamin B-Färbung nach LIISBERG (1968)

Durch diese Färbung ist eine spezifische Darstellung der Keratine möglich. Bei kunststoffeingebetteten Schnitten wurden die Färbezeiten entgegen den Angaben von LIISBERG (1968) verdoppelt. Die Keratine stellen sich leuchtend rot dar, die Kerne werden durch eine Gegenfärbung mit Toluidinblau blau gefärbt.

e) Semiquantitativer Nachweis von Sulhydryl- und Disulfidgruppen in der Epidermis nach BARNETT und SELIGMANN (1952)

1) Nachweis der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen-Nachweis)

Um Sulfhydrylgruppen nachzuweisen, wurde die Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid-(DDD-) Reaktion angewendet. Nach einstündigem Inkubieren der Schnitte in 1 %iger DDD-Lösung wurden die SH-Gruppen durch 1 %iges Fast Blue B-Salz angefärbt.


2) Nachweis der Disulfidgruppen (SS-Gruppen-Nachweis)

Um die Disulfidgruppen nachzuweisen, erfolgte zuerst eine Blockierung der SH-Gruppen mit N-Äthylmaleinimid über 12 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde eine Reduktion der SS-Gruppen zu SH-Gruppen mittels Natriumthioglykolat bei 56 °C über 2 Stunden vorgenommen, an die sich die DDD-Reaktion anschloss.

3) Kontrollreaktion

Diese Reaktion diente dem Nachweis der vollständigen Blockierung der SH-Gruppen und sollte farblos sein. Nach ihrer Blockierung mit N-Äthylmaleinimid schloss sich die DDD-Reaktion an.

Tabelle 1: Schema zur Auswertung der Reaktionsstärke nach KORTE (1987)

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

3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

3.1 Probengewinnung und Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate

Die Proben für die Rasterelektronenmikroskopie stammten von Hufen zehn verschiedener Pferde. Sie wurden zum Teil aus frisch geschlachtetem, zum Teil aus tiefgefrorenem Material entnommen.

a) Untersuchung des Papillarkörpers

Mit Hilfe einer Bandsäge wurde aus dem Zehenrückenteil der Hufe eine 1 cm breite Saggitalscheibe herausgesägt, aus der durch weitere Saggital- und Horizontalschnitte in den bereits bei der Lichtmikroskopie definierten Bereichen ca. 0,5 x 0,5 x 1 cm große Blöckchen gewonnen wurden, die sowohl die Oberhaut als auch die Lederhaut des Kronsegmentes umfassten.

Die nach BAIER (1950) beschriebene Trennung von Dermis und Epidermis an Hufen und Klauen wurde in modifizierter Weise durchgeführt. Die Blöckchen wurden ca. 60 Stunden bei 37 °C in 1 %ige Essigsäurelösung gelegt und anschließend in Leitungswasser gespült. Mittels zweier Pinzetten erfolgte dann durch vorsichtigen Zug die Trennung der beiden Schichten. Hierauf wurde die Lederhaut 12 Stunden in Phosphatpuffer verbracht und anschließend 48 Stunden in 2-4 %iger Glutaraldehydlösung fixiert. Nach erneuter Spülung in Phosphatpuffer erfolgte eine Fixierung mit Osmiumtetroxid und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, an die sich eine Lagerung in HMDS (Fa. Roth GmbH, Karlsruhe) für mindestens 2 Stunden anschloss. Osmiumtetroxid dient dazu, das Herauslösen von Lipiden aus dem Gewebe zu verhindern, indem es ungesättigte Fettsäuren vernetzt und diese fest an Proteine bindet (ROMEIS, 1989). Um ein Verkleben der Papillen zu verhindern, wurde die Lederhaut während des gesamten Vorgangs des Fixierens und Entwässerns durch Nadeln auf Korkplatten befestigt, so dass die Papillen nach unten gerichtet in den Flüssigkeiten frei schwimmen konnten.

Die so entwässerten Präparate wurden einen Tag unter einem Abzug getrocknet und daraufhin auf kleinen Aluminiumtellern mit Hilfe von Leit-C nach GÖCKE (Fa. Plano, Marburg) aufgeklebt. Durch eine anschließende Evakuierung wurde die letzte Flüssigkeit entfernt, so dass die Proben in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron, Watford/England) mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm besputtert werden konnten.

b) Untersuchung des verhornten Gewebes

Unter Zuhilfenahme eines Skalpells wurden aus der Saggitalscheibe des Zehenrückenteils des Hufes die gesamte Lederhaut und die lebende Epidermis entfernt und in den angegebenen Bereichen Proben von ca. 1 cm³ Dicke durch die Gefrierbruchmethode gewonnen. Hierbei wurde das Horn ca. 1 Minute in flüssigen Stickstoff gelegt und anschließend sowohl saggital als auch horizontal unter Zuhilfenahme einer Zange gebrochen. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben, jedoch ohne vorherige Fixation in Glutaraldehyd, weiterverarbeitet. Einige Saggitalscheiben wurden auf ihrer gesamten Länge im Abstand von ca. 1 cm horizontal gefriergebrochen, um den genauen Zeitpunkt des Zerfalls der Markzellen des Röhrenhorns bestimmen zu können.

Die Befunderhebung erfolgte am institutseigenen Rasterelektronenmikroskop NANOLAB 2000 (Fa. Bausch und Lomb, Kanada).

4. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

4.1 Probenentnahme und Herstellung der transmissionselektronenmikroskopischen Präparate

Die Proben für die transmissionselektronischen Untersuchungen entstammten den Hufen acht verschiedener Pferde. Sie enthielten nur verhorntes Gewebe, das nach

Entfernen der Lederhaut und der lebenden Epidermis gewonnen wurde. Die mittels einer Bandsäge erhaltene Saggitalscheibe aus dem Zehenrückenteil wurde noch mal von proximal nach distal durchgesägt, so dass zwei schmale Scheiben entstanden, die entweder das innere oder das mittlere und äußere Kronhorn enthielten. An den jeweiligen Probenentnahmestellen wurden daraufhin unter Zuhilfenahme eines Skalpell ca. 2 x 2 x 5 mm große Blöckchen präpariert.

Nach mehrtägiger Trocknung wurden von den Blöckchen ohne vorherige Einbettung an einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) nativ Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm in horizontaler Schnittrichtung abgenommen, in Aqua dest. aufgefangen, auf Objektträger aufgezogen und mit Methylenblau-Azur gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop konnten aufgrund dieser Übersichtsfärbung dann geeignete Bereiche für Ultradünnschnitte ausgesucht werden, die nach dem Trimmen der Blöckchen mit einem Ultramikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) hergestellt wurden. Die 90 nm dicken Schnitte wurden auf kleinen Kupfernetzen aufgefangen und mit Uranylacetat und Bleizitrat schnittkontrastiert.

Die Befunderhebung erfolgte am institutseigenen Elektronenmikroskop Typ EM 10 CR (Firma Zeiss AG, Oberkochen).

5. Elektrophoretische Untersuchungen

5.1 Probengewinnung und Herstellung der Präparate für die Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Untersuchung erfolgte an Hornproben acht verschiedener Pferde. Es wurden ca. 1 cm³ große Hornproben aus den proximalen, mittleren und distalen Abschnitten des Zehenrückenteiles entnommen, die jeweils zwischen dem inneren, mittleren und äußeren Kronhorn in proximodistaler Richtung geteilt wurden, so dass insgesamt sechs verschiedene Präparate eines Hufes entstanden.

Nach eintägiger Trocknung erfolgte das Raspeln dieser Hornstückchen mittels einer groben Pfeile, um 50 mg Hornspäne zu erhalten. Diese wurden in einem kleinen Eppendorfgefäß aufgefangen, mit 1,25 ml Extraktionspuffer gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rüttler geschüttelt. Der Extraktionspuffer bestand

aus einer Mischung aus Harnstoff und ϵ -Mercaptoethanol, die in Tris-Puffer gelöst wurde.

Nachdem die Proben bei 4 °C zentrifugiert wurden, wurde der Überstand abgegossen. Daraufhin erfolgte die Ausfällung der extrahierten Proteine mit Aceton, der sich ein nochmaliges Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes anschloss. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt, der aus einer Mischung aus Natriumdodecylsulfat (SDS), Bromphenolblau und ϵ -Mercaptoethanol bestand, die in Tris-Puffer gelöst wurde. Das Natriumdodecylsulfat diente der Unterbindung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, wodurch die Proteine in ihre Primärstruktur überführt wurden. Außerdem überdeckt das es die individuellen Ladungsunterschiede der Polypeptide. Auf diese Weise entstanden Micellen, deren Ladung proportional zur Masse des Proteins ist (WESTERMEIER, 1990). Anschließend erfolgte eine Erhitzung über 3 Minuten bei 95 °C und ein nochmaliges Zentrifugieren.

5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um den Proteingehalt der Proben und die dadurch erforderliche Verdünnung mit dem Probenpuffer zu bestimmen, erfolgte eine Messung der Extinktion. Hierzu wurden sie in 0,1 molarer Natronlauge gelöst, mit Biuret-Reagenz versetzt und der Proteingehalt am Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss AG, Oberkochen) bestimmt. Als Eichprotein diente bovines Serumalbumin (Fa. Sigma, Deisenhofen).

5.3 Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte auf einem homogenen SDS-Acrylamidgel. Es wurden jeweils 20 μ l der verdünnten Probe sowie des mit Probenpuffer verdünnten Markers auf das Gel pipettiert und die Elektrophorese in einem elektrischen Feld bei 15 °C durchgeführt. Der Marker enthielt sechs Referenzproteine mit bekannten Molekulargewichten zwischen 14,4 und 94 kDa (Calibration Kit LMW for Electrophoresis, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung aus Ethanol und Eisessig fixiert und anschließend eine Coomassie- oder Silberfärbung durchgeführt. Die erste Methode erfasst Proteinkonzentrationen von 0,2 bis 5,0mg/ml, die zweite solche mit Konzentrationen von 0,01–1,0 mg/ml.

6. Histometrische Untersuchungen

Zur histometrischen Untersuchung wurde das Horn der distalen Probenentnahmestelle von sechs verschiedenen Pferden nativ mit einer Schnittdicke von 20 µm quer geschnitten und mit PAS gefärbt. Über eine digitale Videokamera konnten die Schnitte in den Computer gescannt werden. Das Computerprogramm SPSS® (Version 9.0) erlaubte nun eine Untersuchung verschiedener Parameter. Im inneren, mittleren und äußeren Kronhorn wurden 5 mm² Hornfläche ausgemessen, in der alle Hornröhrchen sowie deren Markflächen mit einem Zeichenstift des Computers umfahren wurden. Es wurden nur Röhrchen berücksichtigt, die vollständig in der eingegrenzten Fläche lagen. Mit Hilfe eines vorher erstellten Makros konnten bestimmte Parameter errechnet werden. Hierzu gehörten die Mark- und Rindenfläche, der maximale und minimale Röhrchen- sowie Markraumdurchmesser, der Anteil an Röhrchenhorn und die Menge an Hornröhrchen pro mm² Horn.

Um einen eventuellen Einfluss der Jahreszeit auf die Architektur des Hornzellverbandes feststellen zu können, wurden bei drei Hufen zusätzlich histometrische Untersuchungen im äußeren Kronhorn entlang des gesamten Zehenrückenteiles im Abstand von jeweils 1-1,5 cm durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messungen wurden in das Computerprogramm Excel® 97 (Microsoft) übertragen und verschiedene Kenngrößen berechnet. Der Medianwert wurde errechnet, da nicht von einer symmetrischen Verteilung der Werte ausgegangen werden kann. Damit die Variationen der ermittelten Parameter ersichtlich sind, wurden auch die minimalen und maximalen Werte der jeweiligen Messungen angegeben. Da in der Literatur in der Regel der Mittelwert angegeben

wird, wurde dieser zusätzlich mit der Standardabweichung berechnet. Letztere soll die Variabilität der Einzelwerte aufzeigen.

7. Messung der Härte des Kronhorns

Die Härtemessung wurde mittels eines Härtemessgerätes nach „Shore“ (Fa. Frank, Weinheim) durchgeführt. Hierbei wurde die Eindringtiefe einer mit einer definierten Kraft herabgedrückten Metallkugel in das Hufhorn ermittelt. Es wurden 1 cm breite Saggitalscheiben aus dem Zehenrückenteil von sieben frisch geschlachteten Pferden untersucht, die proximodistal mit Hilfe einer Bandsäge so geteilt wurden, dass Hornproben entstanden, die entweder das innere, mittlere oder das äußere Kronhorn umfassten. Die Messungen wurden parallel zum Hornröhrchenverlauf im Abstand von 1cm, beginnend am Haaransatz, in Richtung Tragrand durchgeführt. An einer Stelle wurden drei Messungen vorgenommen. Hierbei sollte nicht die absolute Härte des Hufhorns bestimmt werden. Es ging vielmehr darum, die relativen Härtewerte mit den noch weiter unten näher beschriebenen Werten aus der Feuchtigkeitsmessung und den Befunden aus der Licht- und Elektronenmikroskopie sowie der Elektrophorese in Beziehung zu setzen. Die Härte wird in ShoreC-Einheiten von 0-100 angegeben, wobei 100 der maximalen Härte entspricht. Die Anpresskraft betrug 50 Newton.

Mittels des Programms Excel® 97 (Microsoft) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Weiterhin wurden mit Hilfe des Computerprogramms einige Graphiken gezeichnet.

8. Messung des Feuchtigkeitsgehaltes des Kronhorns

Die zur Härtemessung herangezogenen Saggitalscheiben wurden zur Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts in der Art weiterverarbeitet, dass jeweils an den drei weiter oben bereits definierten Materialentnahmestellen des Kronsegments ca. 1 cm³ große Proben gewonnen wurden, die entweder das äußere, mittlere oder das innere

Kronhorn umfassten. Nachdem die Hornstückchen auf einer elektronischen Waage gewogen wurden, erfolgte ihre Trocknung über mehrere Tage in einem Wärmeschrank bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz. Der hierbei erzielte Gewichtsverlust ist mit dem Feuchtigkeitsgehalt der Probe gleichzusetzen.

9. Ermittlung der Abhängigkeit der Härte von der Feuchtigkeit

Um zu ermitteln, ob die Härtewerte von der gemessenen Feuchtigkeit abhängig sind, wurde mit Hilfe des Computerprogramms Excel® 97 (Microsoft) der Pearsonsche Korrelationskoeffizient errechnet. Letzterer wird in Werten zwischen +1 und -1 dargestellt. Ein negativer Wert zeigt an, dass eine Erhöhung des Wertes eines Parameters mit einer Erniedrigung des Wertes des anderen einhergeht. Um zu analysieren, ob von einer relevanten Korrelation ausgegangen werden kann, wurden zusätzlich die p-Werte ermittelt. Als statistisch aussagefähig werden Korrelationskoeffizienten gewertet, die einen dazugehörigen p-Wert aufweisen, der niedriger als 0,05 ist.