

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der  
Universität Tübingen

**Die Veränderungen der knöchernen Integrität über den  
Verlauf der Alterung und der Einfluss auf das oxidative  
System im Tiermodell – die duale Rolle des  
Antioxidans NAC**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Siemens, Christopher**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. K. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 12.09.2018

Ich widme diese Arbeit  
meiner Großmutter Frau Doris Stemmann für das, was Sie mir ermöglicht hat  
sowie meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, in Liebe und Dankbarkeit.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>II. Glossar.....</b>	<b>8</b>
<b>III. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
III.I Abbildungen.....	10
III.II Tabellen.....	11
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>13</b>
1.1 Alterung .....	13
1.2 Knöcherne Integrität mit altersabhängigen Implikationen .....	16
1.3 Antioxidatives System im menschlichen Körper und Antioxidantien .....	25
1.4 Hitzestress im Verlauf der Alterung.....	30
1.5 Ziel des Projekts .....	31
<b>2. Material und Methodik .....</b>	<b>33</b>
2.1 Tiere.....	33
2.2 Behandlung mit Hitzestress .....	34
2.3 Behandlung mit N-Acetyl-L-Cystein .....	35
2.4 Präparation des Unterleibs der Wistar-Ratten.....	35
2.5 Biomechanische Stabilitätsmessung [115].....	37
2.6 Computertomographie – $\mu$ CT Analyse [116, 117].....	38
2.7 Statistische Analyse.....	43
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1 Veränderung der knöchernen Integrität im Verlauf der Alterung.....	44

3.1.1 Effekt der Alterung auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT.....	44
3.1.2 Länge der Femura.....	44
3.1.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen.....	45
3.1.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen.....	46
3.1.5 Anzahl der Trabekel.....	47
3.1.6 Dicke der trabekulären Struktur.....	48
3.1.7 Abstände zwischen den Trabekeln.....	49
3.1.8 Trabekulärer Pattern-Faktor.....	50
3.1.9 Kortikales Volumen.....	52
3.2 Veränderung der knöchernen Integrität durch Hitzestress-Behandlung..... im Verlauf der Alterung.....	53
3.2.1 Einfluss von Hitze auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT.....	53
3.2.2 Länge der Femura.....	53
3.2.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen.....	54
3.2.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen.....	55
3.2.5 Dicke der Trabekel.....	57
3.2.6 Anzahl der Trabekel.....	59
3.2.7 Intertrabkulärer Abstand.....	60
3.2.8 Trabekulärer Pattern-Faktor.....	61
3.2.9 Kortikales Volumen.....	62
3.3 Einfluss von NAC auf die Knochenstruktur im Verlauf der Alterung.....	63
3.3.1 Effekt von NAC auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT.....	63
3.3.2 Länge der Femura.....	63
3.3.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen.....	65
3.3.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen.....	67

3.3.5 Dicke der Trabekel .....	69
3.3.6 Anzahl der Trabekel .....	71
3.3.7 Intertrabekulärer Abstand .....	72
3.3.8 Trabekulärer Pattern-Faktor .....	73
3.3.9 Kortikales Volumen .....	75
3.4 Ergebnisse der biomechanischen Stabilitätsmessung .....	76
3.4.1 Steifigkeit.....	76
3.4.2 Displacement at max. load .....	78
3.4.3 Spannung .....	80
3.4.4 Biegemoment .....	82
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	84
3.5.1 Effekt der Alterung im $\mu$ CT .....	84
3.5.2 Effekt der Hitzestress-Behandlung im $\mu$ CT .....	84
3.5.3 Effekt der NAC-Behandlung im $\mu$ CT.....	84
3.5.4 Biomechanische Stabilitätsmessung .....	85
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>86</b>
4.1 Effekt der Alterung auf den Knochen .....	87
4.2 Effekt von NAC auf den Knochen in Bezug zum Organ Leber.....	87
4.3 Art und Verabreichung des Antioxidans NAC .....	89
4.4 Behandlung durch Hyperthermie .....	89
4.5 Darstellung der Tiere .....	90
4.6 Leber-Knochen-Achse .....	91
4.7 Weitere Untersuchungen und Limitierungen .....	92
4.8 Konklusion und Ausblick .....	92

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....</b>	<b>117</b>
<b>8. Veröffentlichungen.....</b>	<b>118</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>119</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

- H	ohne Hitzestress-Behandlung
- NAC	ohne NAC-Behandlung
+ H	mit Hitzestress-Behandlung
+ NAC	mit NAC-Behandlung
μCT	Mikro-Computertomographie
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	8-iso-Prostaglandin F <sub>2α</sub>
Abb.	Abbildung
ACC	Acetylcystein
Art.	Articulatio
ATP	Adenosintriphosphat
BS/BV	BoneSurface/BoneVolume
BV/TV	BoneVolume/TotalVolume
bzgl.	bezüglich
CAT	Katalase
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlormethan
col1A1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Computertomographie
CV	CorticalVolume
DAML	Displacement at. max. load
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
etc.	et cetera
EZM	Extrazellulärmatrix
Fox	Forkhead box
GAG	Glykosaminoglykane
GCL	γ-Glutamyl-Cystein-Ligase
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, γ-Glutamylcysteinylglycin



GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IsoPs	Isoprostane
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
M	Monate
MAD	Malondialdehyd
MSC	Mesenchymal stem cells
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NADP <sup>+</sup> (oxidierte Form)	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NADPH (reduzierte Form)	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NOX	NADP(H)-Oxidase
Nr.	Nummer
∅	kein, keiner, keine, nicht
O <sub>2</sub> -•	Superoxidanion, Hyperoxidanion
OP	Operation/Operationsbereich
OSG	Oberes Sprunggelenk
p	Signifikanz
PKA	Proteinkinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated receptor
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
ROI	Region of interest
ROS	Reactive Oxygen Species
RunX2	Runt-related transcription factor 2
SOD	Superoxiddismutase

Sp7/Osterix	Transcription factor 7
SPECT	Single Photon Emission CT
Tb.N	Trabecular number
Tb.Pf	Trabecular pattern factor
Tb.Sp	Trabecular spacing
Tb.Th	Trabecular thickness
TBARS	Thiobarbitursäure
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
v. Chr.	vor Christi Geburt
Vergl.	Vergleich
vgl.	vergleiche
W	Wochen
Wnt	Wingless + Int-1

## II. Glossar

Acetabulum	Hüftgelenkspfanne
ad libitum	ganz nach Belieben
Apophyse	Knochenfortsatz
Articulatio genus	Kniegelenk
Articulatio talocruralis	Oberes Sprunggelenk
axial/transversal	in der Horizontalebene
Caput femoris	Oberschenkelkopf
Caput	Kopf
Collum	Hals
Condylus lateralis femoris	zur Seite hin gelegener, körperferner Gelenkfortsatz des Oberschenkelknochens
Condylus medialis femoris	zur Körpermitte hin gelegener, körperferner Gelenkfortsatz des Oberschenkelknochens
Corpus	Körper, Schaft
Corticalis	Knochenrinde
Diaphyse	Knochenschaft
distal	körperfern gelegen
Epiphyse	Knochenende
Epiphysenfuge	Wachstumsfuge
Evaporation	Verdunstung
Extremitas inferior	Untere Extremität
extrinsisch	von außen her
Femur	Oberschenkelknochen
Fibula	Wadenbein
intraperitoneal	innerhalb der Bauchhöhle
intrinsisch	von innen her
koronal/frontal	Vorderansicht
Ligamentum/Ligament	Band, Bandstruktur

Metaphyse	Knochenabschnitt zwischen Diaphyse und Epiphyse
mukolytisch	schleimlösend durch Produktion von dünnflüssigem Schleim zum besseren Abhusten
Mukopolysaccharide	Glykosaminoglykane (aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaute Polysaccharide)
Off-Label-Use	therapeutischer Einsatz außerhalb des Indikationsgebietes
Ossa longa	Röhrenknochen
Periost	Knochenhaut
perivaskulär	Gefäße umgebend
Progenitorzelle	Vorläuferzelle
proximal	körpernah gelegen
sagittal	pfeilwärts, von vorne nach hinten
sekretolytisch	schleimlösend durch Verflüssigung des bestehenden Bronchialschleims
sekretomotorisch	motilitätsfördernd mit verbessertem Schleimabtransport
Spongiosa	Trabekelsystem
Tendo calcaneus	Achillessehne
Tibia	Schienbein
Trochanter major	Großer Rollhügel, kräftiger Knochenvorsprung des Femurs
Tuber calcanei	Fersenbeinhöcker
Vasodilatation	Gefäßweitstellung
zirkumferent	umkreisend

### III. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### III.I Abbildungen

Abbildung 1: Populationspyramiden von 2010 und 2050 in Deutschland.....	13
Abbildung 2: Populationspyramiden im direkten Vergleich.....	14
Abbildung 3: Darstellung eines langen Röhrenknochens mit Spongiosa.....	16
Abbildung 4: Beispielhafter histologischer Ausschnitt des Knochens.....	17
Abbildung 5: Oxidativer Stress am Knochen im Verlauf der Alterung.....	20
Abbildung 6: Mesenchymale Progenitorzellen.....	22
Abbildung 7: Interaktion von ROS-bedingten Veränderungen.....	23
Abbildung 8: Wirkung und Regeneration von Glutathion.....	26
Abbildung 9: Überblick über ROS, Glutathion und NAC.....	27
Abbildung 10: Behandlung mit Hitzestress.....	34
Abbildung 11: Applikation von NAC als Antioxidans.....	35
Abbildung 12: Schritte der Präparation der Wistar-Ratten.....	36
Abbildung 13: Biomechanischen Stabilitätsmessung mit 4-Punktbiegetest.....	37
Abbildung 14: Darstellung verschiedener, gebrochener Knochen.....	37
Abbildung 15: Siemens-Inveon-MultiModality-SPECT/CT.....	38
Abbildung 16: Darstellung eines eingescannten Knochendatensatzes.....	39
Abbildung 17: Darstellung zurechtgeschnittener, eingescannter Datensätze...	39
Abbildung 18: Längenmessung in sagittaler Ebene.....	40
Abbildung 19: Trabekulärer Bereich mit Vorlagenwürfel.....	41
Abbildung 20: Eingesetzter Vorlagenwürfel mit farblicher Markierung.....	41
Abbildung 21: Geöffneter Knochendatensatz mit farblicher Markierung.....	42
Abbildung 22: Effekt der Alterung auf die Knochenlänge.....	45
Abbildung 23: Effekt der Alterung auf das Knochenvolumen.....	46
Abbildung 24: Effekt der Alterung auf die Knochenoberfläche.....	47
Abbildung 25: Effekt der Alterung auf die Anzahl der Trabekel.....	48
Abbildung 26: Effekt der Alterung auf die Dicke der Trabekel.....	49
Abbildung 27: Effekt der Alterung auf den intertrabekulären Abstand.....	50
Abbildung 28: Effekt der Alterung auf den <i>Pattern</i> -Faktor.....	51
Abbildung 29: Effekt der Alterung auf das kortikale Volumen.....	52

Abbildung 30: Effekt von Hitze auf die Knochenlänge .....	54
Abbildung 31: Effekt von Hitze auf das Knochenvolumen .....	55
Abbildung 32: Effekt von Hitze auf die Knochenoberfläche .....	56
Abbildung 33: Effekt von Hitze auf die Dicke der Trabekel .....	58
Abbildung 34: Effekt von Hitze auf die Anzahl der Trabekel .....	59
Abbildung 35: Effekt von Hitze auf den intertrabekulären Abstand .....	60
Abbildung 36: Effekt von Hitze auf den <i>Pattern</i> -Faktor .....	61
Abbildung 37: Effekt von Hitze auf das kortikale Volumen .....	62
Abbildung 38: Effekt von NAC auf die Knochenlänge .....	64
Abbildung 39: Effekt von NAC auf das Knochenvolumen .....	66
Abbildung 40: Effekt von NAC auf die Knochenoberfläche .....	68
Abbildung 41: Effekt von NAC auf die Dicke der Trabekel .....	70
Abbildung 42: Effekt von NAC auf die Anzahl der Trabekel .....	71
Abbildung 43: Effekt von NAC auf den intertrabekulären Abstand .....	73
Abbildung 44: Effekt von NAC auf den <i>Pattern</i> -Faktor .....	74
Abbildung 45: Effekt von NAC auf das kortikale Volumen .....	75
Abbildung 46: Steifigkeit der Knochen .....	77
Abbildung 47: DAML der Knochen .....	79
Abbildung 48: Spannung der Knochen .....	81
Abbildung 49: Biegemoment der Knochen .....	83

### **III.II Tabellen**

Tabelle 1: Überblick und Einteilung der Versuchstiere .....	33
Tabelle 2: Technische Parameter der Mikro-Computertomographie .....	39
Tabelle 3: Interessensparameter der Mikro-Computertomographie .....	44

Lizenz- / Urheberrecht (Copyright):

Die Abbildungen 1 und 2 wurden durch das Statistische Bundesamt für „*Vervielfältigung und Verbreitung mit Quellennachweis*“ im Impressum unter *Copyright allgemein* und zusätzlich auf telefonische Nachfrage für die Nutzung in dieser Dissertationsschrift freigegeben.

URL [Zugriff: 08.06.2017, 16:32 Uhr]:

<https://service.destatis.de/bevoelkerungspyramide/#!y=2050&o=2010><sup>\*1</sup>

Die Abbildungen 3 und 4 wurden nach schriftlicher Nachfrage bei der MIAMED GmbH unter Angabe der Quelle ausdrücklich für die Nutzung in dieser Dissertationsschrift freigegeben.

URL [Zugriff: 08.06.2017, 16:32 Uhr]:

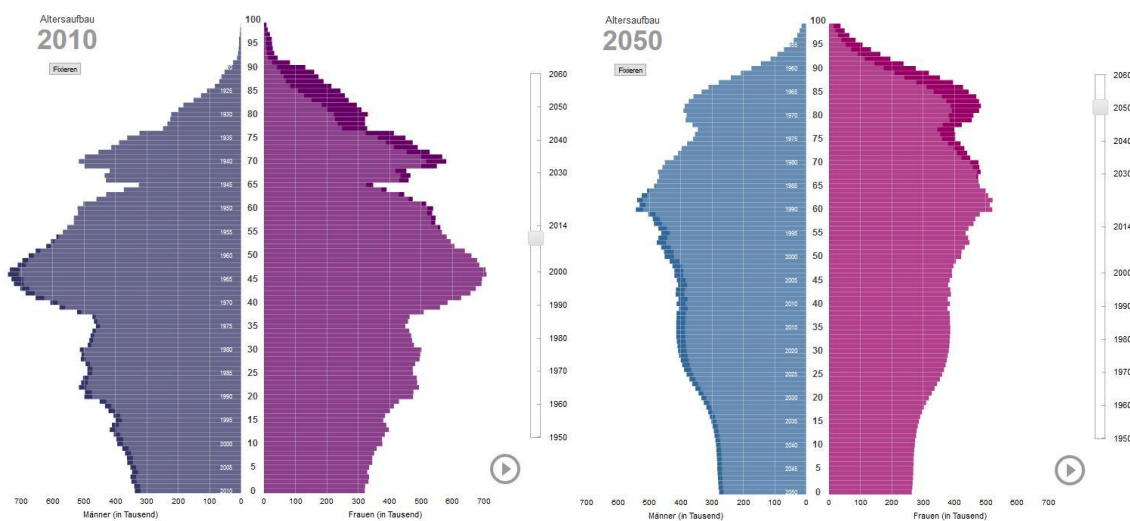
<https://amboss.miamed.de/library#xid=2o0TYS&anker=Z08acbb01dc36e1793a025506872c7b3d><sup>\*2</sup>

Alle weiteren Abbildungen, Graphiken und Tabellen wurden eigens angefertigt und erstellt.

# 1. Einleitung

## 1.1 Alterung

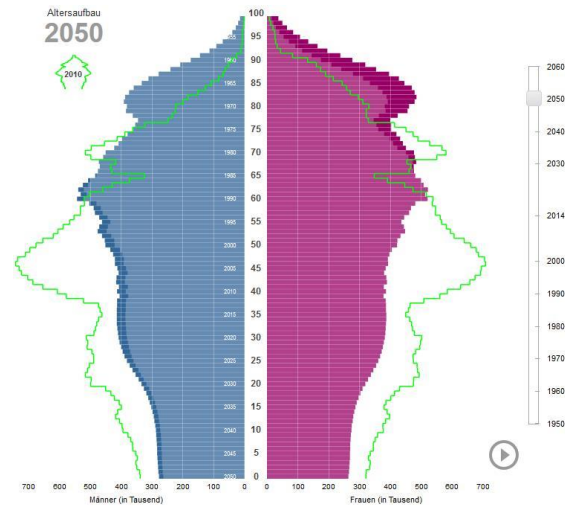
Ein seit jeher bestehender Traum der Menschheit ist der des ewigen Lebens, schon im alten Griechenland verzichteten die Götter auf Nektar und Ambrosia für Unsterblichkeit und Jugend [12, 13]. Eine große Leistung der letzten Jahrzehnte ist die, dass die mittlere Lebenserwartung in den Industrienationen kontinuierlich angestiegen ist [14]. Dies ist zum einen bedingt durch eine steigende Qualität des Gesundheitswesens, verbesserte Hygiene und höhere medizinische Standards, zum anderen aufgrund steigender Lebensmittelproduktion sowie verbesserter Bildung [15]. Das *National Institute of Aging* spricht von einer Zunahme der gealterten Bevölkerung ( $\geq 65$  Jahre) von 524 Millionen in 2010 auf bis zu 1,5 Milliarden weltweit im Jahre 2050, welches fast eine Verdreifachung darstellt [16].



**Abbildung 1:** Populationspyramiden darstellend die Altersverteilung im Vergleich zwischen Männern und Frauen in Deutschland von 2010 (links) und 2050 (rechts) (modifiziert nach Statistischem Bundesamt, 2017)\*<sup>1</sup>.

Im Vergleich dazu wird in Deutschland das Medianalter in 2010 von 44,1 Jahre auf 50,9 Jahre in 2050 steigen und es zu einer Zunahme der gealterten Bevölkerung ( $\geq 65$  Jahre) von 16,8 Millionen (21% der Gesamtbevölkerung) auf 22,7 Millionen (32% der Gesamtbevölkerung) kommen (Abbildung 1 und 2) [17].





**Abbildung 2:** Populationspyramiden von 2010 und 2050 im direkten Vergleich (modifiziert nach Statistischem Bundesamt, 2017)\*<sup>1</sup>.

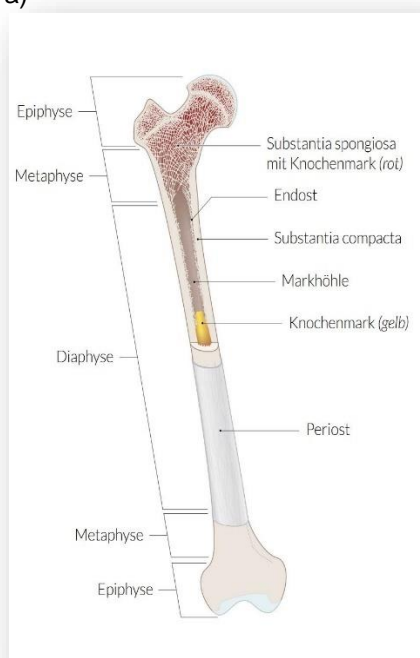
Mit der großen Leistung der Zunahme an Lebenserwartung geht aber auch eine neue Herausforderung bezüglich altersassoziierter Erkrankungen wie beispielsweise kardiovaskulärer, neurologischer und onkologischer Leiden einher, welche die Lebensqualität der gewonnenen Jahre im Alter wiederum stark einschränken können [18, 19]. Umgangssprachlich wird „Alterung“ meist übereinstimmend mit negativen Aspekten wie Verfall, Verschlechterung und Degeneration gleichgesetzt. Positiver besetzte Assoziationen wie Altersweisheit, Erfahrungsschatz und Achtung vor dem Alter treten häufig in das zweite Glied. Altern bestimmt alle Bereiche menschlicher Existenz (biologisch, psychisch, sozial, kognitiv und kulturell), vor allem das Altern als biologisches und chemisch-physikalisches Wesensmerkmal des Lebens, das bis dato von keiner allgemein akzeptierten wissenschaftlichen Definition erfasst wird [20]. Gleichwohl ist Alterung im biologischen Sinne ein universeller, systemimmanenter, durch zeitgebundene Veränderungen charakterisierter, einbahnstraßenmäßig verlaufender, dynamischer, bisher unabwendbarer physiologischer Prozess fast aller Organismen [21, 22]. Dieser Verlauf wird durch subjektive (kognitive, psychische), soziale, biographische (*Life events*), kulturelle und eben biologische Aspekte beeinflusst [18, 23]. Der Begriff „Seneszenz“ in diesem Zusammenhang beschreibt fokussiert die Vergreisung des Alterns im Sinne sensorischer, kognitiver und körperlicher Verfallserscheinungen beim Menschen als

degenerativem Abschnitt des Alterns, obgleich nicht immer zwischen Altern und Seneszenz unterschieden werden kann [24]. Das Altern wird dabei in ein primäres (intrinsisches) und ein sekundäres (extrinsisches) Altern eingeteilt, wobei die primäre Alterung das physiologische Altern beschreibt und die sekundäre Alterung die durch äußere Einflüsse geprägte Alterung [25]. Das primäre Altern wird dabei unabhängig von Krankheiten durch zelluläre Alterungsprozesse hervorgerufen und als Form definiert, die die maximal erreichbare Lebensspanne eines Organismus widerspiegelt [26]. Krankheiten, Bewegungsmangel, Suchtmittel, Fehlernährung, der eigene Lebensstil und weiteres prägen hingegen das sekundäre Altern und können die maximal erreichbare Lebensspanne verkürzen [25]. Das Altern ist laut *British Medical Journal* und dem *Food and Drug Administration* an sich keine Krankheit oder primäre Todesursache, sondern ein physiologischer Vorgang und eher ein Risikofaktor für die Gesundheit [27-29]. Dem biologischen Altern gegenüber gestellt existieren noch weitere Formen des Alterns, das nicht-biologische Altern. Dazu zählen Formen wie beispielsweise psychologisches Altern und soziales Altern. Das psychologische Altern beschreibt bei Menschen die Veränderungen auf kognitiver Ebene, was Wissenserfahrungen, Handlungsstrategien und das menschliche Wissenssystem anbelangt. Das soziale Altern wird geprägt durch Veränderungen in der sozialen Position wie beispielsweise das Ende des Berufslebens und der Beginn des Rentenalters, also das Erreichen eines bestimmten Alters oder eines bestimmten Status [30]. Alterung ist somit ein vielschichtiger Gesamtprozess von Veränderungen, der sich im Zeitverlauf ab der Geburt bis schlussendlich zum Exitus eines Individuums vollzieht, oder wie es Pompeo Batoni aus dem Jahr 1746 mit Hilfe seines Ölgemäldes „*Die Zeit befiehlt dem Alter, die Schönheit zu zerstören*“ beschreibt [31]. Obwohl die genauen Prozesse bisher noch nicht vollständig verstanden sind und es bis dato keine allgemein akzeptierte wissenschaftliche Definition gibt, lassen sich Alterungsprozesse als universell, unumkehrbar, funktions- und anpassungsvermindert, genetisch-biologisch sowie psychisch-sozial determiniert und so gesehen als multifaktorielles Ereignis in Grundzügen charakterisieren [25].

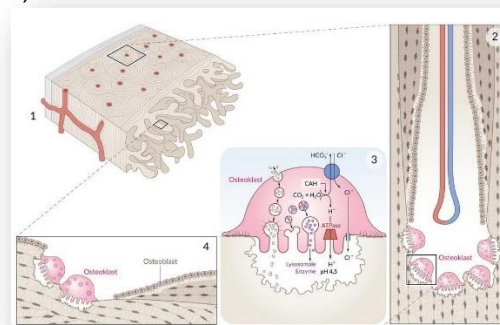
## 1.2 Knöcherner Integrität mit altersabhängigen Implikationen

Das knöcherner Skelett des menschlichen Körpers besteht aus ca. 210 anatomisch-makroskopisch abgrenzbaren Knochen. Ein Knochen wird eingeteilt in Schaft (Diaphyse, Corpus) und Ende des Schafts (Epiphyse) sowie einem dazwischenliegenden verbreiterten Knochenabschnitt (Metaphyse), der Vorsprünge (Apophysen) für die Befestigung von Muskeln, Sehnen und Bändern besitzt (Abbildung 3) [32]. Die sogenannte Epiphysenfuge liegt zwischen der Epi- und Metaphyse und verknöchert mit Abschluss des Skelettwachstums [32]. Die Epiphysen sowie Metaphysen bestehen primär aus spongiösem Knochen (Spongiosa, trabekulärer Anteil), wohingegen im Bereich der Diaphysen von Röhrenknochen (Ossa longa) diese weitgehend fehlt (Abbildung 3) [33]. Umgeben wird das Knocheninnere von einer Knochenrinde (Corticalis), welche im Epiphysen- und Metaphysenbereich relativ dünn ist, darauffolgend kommt die Knochenhaut (Periost) mit Ausnahme von Gelenkflächen [32].

a)

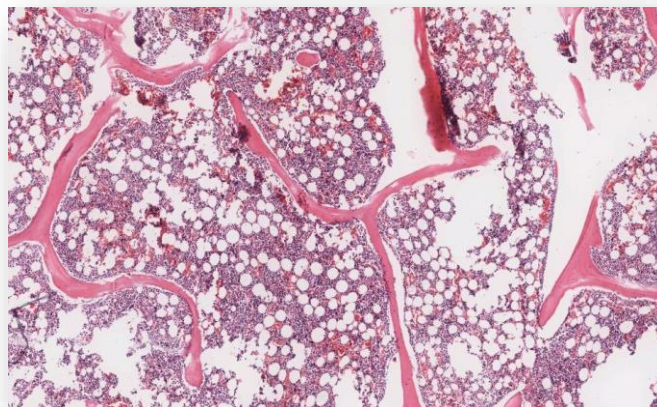


b)



**Abbildung 3:** a) Darstellung eines langen Röhrenknochens (Ossa longa) mit Einteilung in Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse und b) Einblick in den spongiösen, respektive trabekulären Bereich mit verschiedenen Zelltypen des Knochens (modifiziert nach Miamed.Amboss, Lernkarte: Knochengewebe [Online im Internet], 2017)<sup>2</sup>.

Das blutbildende Knochenmark erfüllt die Zwischenräume der Spongiosa beim Erwachsenen, wobei das gelbe Knochenmark im Bereich der Diaphyse des Knochens vorkommt [32]. Die Spongiosa des Knochens dient der optimalen Stabilität bei wenig Material, das heißt es liegt eine trajektorieell ausgerichtete Architektur der Spongiosa vor, welche den Zug- und Druckspannungslinien folgt. Somit ergibt sich eine bei veränderten mechanischen Belastungen durch Umorientierung bestmögliche Anpassung des Knochens [32]. Histologisch betrachtet besteht der Knochen aus verschiedenen Zelltypen, den Osteoblasten (knochenbildende Zellen), Osteozyten (differenzierte Osteoblasten), Osteoklasten (knochenabbauende Zellen) sowie mineralisierter Extrazellulärmatrix, kurz EZM (Hauptkomponenten: Kollagenfibrillen und Hydroxyapatit-Kristalle) (Abbildung 4) [33].



**Abbildung 4:** Beispielhafter histologischer Ausschnitt des Knochenmarks in der Spongiosa des Knochens (modifiziert nach Miamed.Amboss, Lernkarte: Knochengewebe, Smart Zoom, Bild in der digitalen Mikroskopie: PD Dr. med. A. Bouza, [Online im Internet], 2017)<sup>2</sup>.

Des Weiteren wird histologisch zwischen einem unreifen Knochengewebe, welches geflechtartig verwoben ist (Geflechtknochen) und einem reifen Knochengewebe, welches dagegen in erkennbaren Schichten (Lamellen) strukturiert ist, unterschieden [33]. Knochengewebe befindet sich durch das Zusammenspiel der Osteoblasten und Osteoklasten zeitlebens im Umbau. Diese Bauprinzipien des Knochens verleihen ihm die kombinierten Eigenschaften aus Elastizität und Härte (Schutz- und Stützfunktion), Bewegung im 3-dimensionalen Raum, um dadurch verschiedenartigen Beanspruchungen standzuhalten und darüberhinausgehend als Calciumreservoir und Ort der Blutbildung zu fungieren [33].

Des Weiteren findet ein lebenslanger, kontinuierlicher Umbauprozess der Knochenmasse statt, welcher aus einem Gleichgewicht aus Abbau, Aufbau und Umbau besteht [34]. Es handelt sich um einen langwierigen Prozess, wobei ca. 0,5% an Knochenmasse pro Jahr verloren gehen und es ca. 5 – 10 Jahre dauert bis der Knochen gänzlich remodelliert und umgebaut wurde [34]. Es zeigt sich, dass ein am Knochen verlangsamter Stoffwechsel- und Modellierungsprozess vorliegt [34].

Im Verlauf der Alterung verändert sich die knöchernen Integrität auf verschiedenen Ebenen: zum einen nimmt die Stärke des Knochens bedingt durch Abnahme der trabekulären und kortikalen Dichte ab und zum anderen damit korrespondierend kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten mit einhergehendem Verlust von Knochenmasse [1]. Dieses Ungleichgewicht auf Seiten der Osteoblasten im Verlauf der Alterung wird zurückgeführt auf eine Abnahme mesenchymaler Stammzellen (MSCs), eine defekte Proliferation, respektive Differenzierung von Progenitorzellen oder einer Diversion dieser in Richtung einer Adipogenese und einer Zunahme der Apoptose [1]. Dies wird hinzukommend beeinflusst von beispielsweise (altersassoziierten) Stoffwechselerkrankungen, den Lebensumständen und auch den Lebensgewohnheiten. Nussler et al. konnten zeigen, dass Patienten, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, ein erhöhtes Fraktur-Risiko sowie eine verzögerte Frakturheilung, abhängig von Erkrankungsdauer, therapeutischer Einstellung und zusätzlichen Komorbiditäten wie chronischen Nephropathien oder Osteoporose, welche ebenfalls einen negativen Einfluss auf die knöchernen Integrität nehmen, haben [35]. Des Weiteren führt beispielsweise die Lebensgewohnheit des Rauchens durch Induktion von unter anderem oxidativem Stress mit dadurch erhöhten Spiegeln an Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer Schädigung der osteoblastären Knochenformation [36]. Im Ganzen nimmt im Verlauf der Alterung die knöchernen Integrität ab. Jedoch sind die der Alterung von Organismen zugrundeliegenden multifaktoriellen wie molekularen und zellulären Prozessen und Theorien zwar bekannt, stellen aber wissenschaftlich wenig verstandene Phänomene dar.

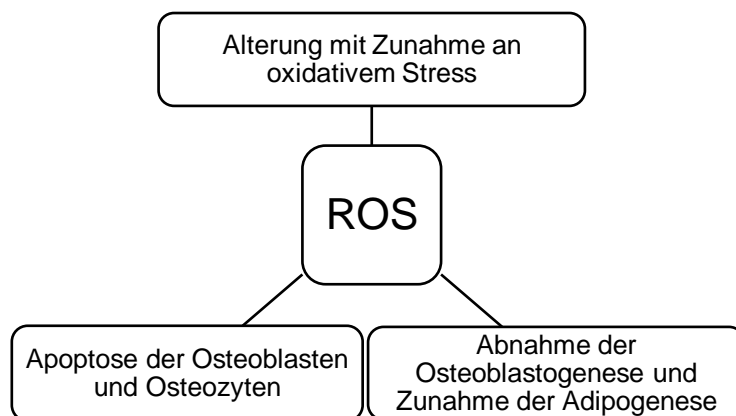
Ein Beispiel stellt die „*Theorie der Freien Radikale*“ von Denham Harman aus dem Jahre 1956 dar, die besagt, dass Radikale während des Prozesses der Alterung in der Zelle akkumulieren und als hochreaktive Moleküle einen toxischen Effekt auf die Zelle haben, indem sie zelluläre Signale unterbinden, die DNS schädigen und Apoptose induzieren [37, 38]. Dieser oxidative Stress, wozu die freien Radikale zählen, wie zum Beispiel die Superoxidanionen, Wasserstoffperoxide als intrinsische Faktoren oder auch extrinsische Faktoren, wie UV-Licht und Hitze, welche die Menge an freien Radikalen in den Zellen verstärken und damit den schädigenden Effekt intensivieren, führt zu einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem antioxidativen Schutzsystem [39, 40]. ROS, insbesondere freie Radikale, sind aufgrund ihres ungepaarten Elektrons chemisch instabil und hoch reaktiv, wodurch sie anderen Molekülen Elektronen entziehen können, um in einen stabilen Zustand überzugehen [41]. Dabei kann es zu veränderten Eigenschaften mit resultierenden Funktionsstörungen innerhalb der Zelle kommen [42]. Insbesondere die Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran ist eine der Hauptentstehungsquellen in Körperzellen für ROS, bedingt durch den dort teils stattfindenden sauerstoffabhängigen Metabolismus, wobei die mitochondriale DNA durch ihre fehlenden protektiven Histone sowie DNA-Bindungsproteine besonders anfällig ist für Mutationen [1, 40, 43, 44]. Dies führt zu einer veränderten Genexpression durch oxidativen Stress in Form von ROS im Verlauf der Alterung [1, 40, 43, 44]. Insgesamt kommt es so zu einer zunehmenden Produktion an ROS im Verlauf des Alterungsprozesses, wodurch es vermehrt zu einer Akkumulation an mtDNA-Mutationen sowie zu einer Zunahme an oxidativen Stress in den Mitochondrien kommt [40, 43, 44]. Diese Zunahme der ROS im Verlauf der Seneszenz führen zu einer gesteigerten Anfälligkeit des Gewebes gegenüber oxidativen Verletzungen in verschiedensten Organen wie beispielsweise im Knochen und in der Leber [45]. Im Knochen führt oxidativer Stress zu einer Veränderung in der Expression und in der Signalkette von lokalen Wachstumsfaktoren, wodurch es zu einer veränderten interzellulären Kommunikation kommt [7].

Im Folgenden sind die Interaktionen von ROS-bedingten Veränderungen auf molekularer, zellulärer und gewebsspezifischer Ebene in Bezug auf die knöchernen Integrität im Verlauf der Alterung dargestellt.

In Osteoblasten führt ROS zu einer Dysfunktion, Dedifferenzierung und Apoptose durch kontinuierliche Produktion, was zu einer lipiden Peroxidation, Schädigung von Proteinen und DNS-Läsionen führt [46-48].

Diese lipide Peroxidation, welche eine durch oxidativen Stress bedingte Kettenreaktion darstellt, führt beispielsweise zu Veränderungen in der Struktur und Funktion von Lipiden in den protektiven Membranen von Zellen [49]. In Osteoklasten führt ROS zu einer Stimulation dieser lipiden Peroxidation mit dadurch bedingtem Knochenabbau [1].

Bekannt ist, dass oxidativer Stress die skelettale Homöostase auf molekularer Ebene stört, in dem es zu Deletionen von wichtigen Transkriptionsfaktoren wie FoxO1, 3 und 4 führt [50]. Hieraus resultiert eine Zunahme an oxidativem Stress im Knochen, eine Abnahme an Osteoblasten, damit einhergehend eine Verringerung der Knochenmasse sowie schlussendlich eine Abnahme der knöchernen Integrität (Abbildung 5) [1]. Diese Transkriptionsfaktoren FoxO1, 3 und 4 werden durch Wachstumsfaktoren und Insulin gehemmt sowie durch Nährstoffkonstellationen und ROS-induzierte posttranslationale Modifikationen beeinflusst [51].



**Abbildung 5:** Überblick über die Auswirkungen von oxidativem Stress (Reaktive Sauerstoffspezies, ROS) am Knochen im Verlauf der Alterung [1, 8].

Es konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Deletion der Transkriptionsfaktoren zu einem erhöhten oxidativen Stress im Knochen führt [52].

Die verminderte Knochenmasse wurde auf eine mangelhafte Knochenbildung, bedingt durch eine verminderte Osteoblastenzahl durch eine erhöhte Osteoblasten-Apoptose, zurückgeführt [9]. Im Gegensatz dazu zeigt der Funktionsgewinn von FoxO3 einen verminderten oxidativen Stress in Osteoblasten mit einer Abnahme in der Osteoblastenapoptose mit erhöhter Osteoblastenzahl und einer Zunahme in der Knochenmasse [53].

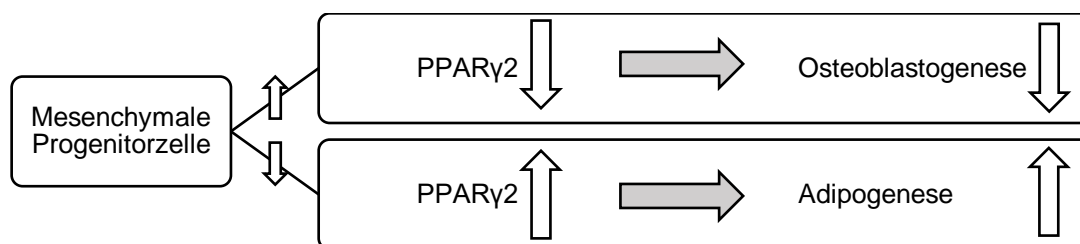
Die Deletion von FoxO1 hingegen zeigt in *coL1A1*-exprimierenden Knochenzellen eine verringerte Osteoblastenzahl sowie damit verbunden eine verringerte Knochenmasse in Folge eines erhöhten ROS-Spiegels [53]. Hinzukommend führt diese FoxO1-Deletion zu einer gestörten Proteinsynthese in den Osteoblasten mit einer Abnahme in der Glutathion- und Kollagen-Synthese [53]. Somit zeigt sich, dass FoxO eine zentrale Funktion in der Wirkung von oxidativem Stress (ROS) auf die Knochenbildung einnimmt [52, 53].

Des Weiteren ist bekannt, dass es zu einer Inhibierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges durch ROS im Knochen kommen kann [54]. Dieser Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist unentbehrlich für die Osteoblastogenese und jede Schädigung dieses Signalweges geht mit einem Verlust an Knochenmasse einher [6].  $\beta$ -Catenin ist ein wesentlicher Co-Aktivatoren von FoxO und ist erforderlich für die Stimulation von FoxO-Zielgenen in Osteoblasten und anderen Zelltypen [2, 54]. ROS induziert die Assoziation von FoxO mit  $\beta$ -Catenin durch eine Förderung der FoxO-vermittelten Transkription auf Kosten der Wnt-gestützten Osteoblasten-Differenzierung [55]. Durch die Fähigkeit von FoxO das  $\beta$ -Catenin abzuspalten kann die Proliferation sowie die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläufern eingeschränkt werden und so zu einer verminderten Knochenbildung mit einem Verlust an Knochenmasse im Verlauf der Alterung führen [55].



Somit übernimmt  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle in Bezug auf die Interaktion von ROS auf die Osteoblastogenese.

In diesem Zusammenhang steht auch der *Peroxisome Proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ 2*, ein Transkriptionsfaktor, welcher essentiell für die Adipogenese ist, und mit zunehmender Alterung vermehrt in Mäuseknochen vorkommt [9, 56]. Die Hemmung der Wnt-vermittelten Transkription führt zu einer gesteigerten Expression von *PPAR $\gamma$ 2* [2, 3]. Osteoblasten und Adipozyten entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der mesenchymalen Stammzellreihe im Knochenmark. Akune et. al. konnten zeigen, dass eine verstärkte *PPAR $\gamma$ 2*-Expression in Progenitorzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des gealterten Knochens spielt durch Begünstigung der Differenzierung von MSCs in Richtung der Adipozyten anstelle von Osteoblasten [1]. Gestützt wird dies durch den Nachweis einer gesteigerten Anzahl an Osteoblasten sowie einer Zunahme an Knochenmasse in Mäusen mit *PPAR $\gamma$ 2*-Insuffizienz [57].

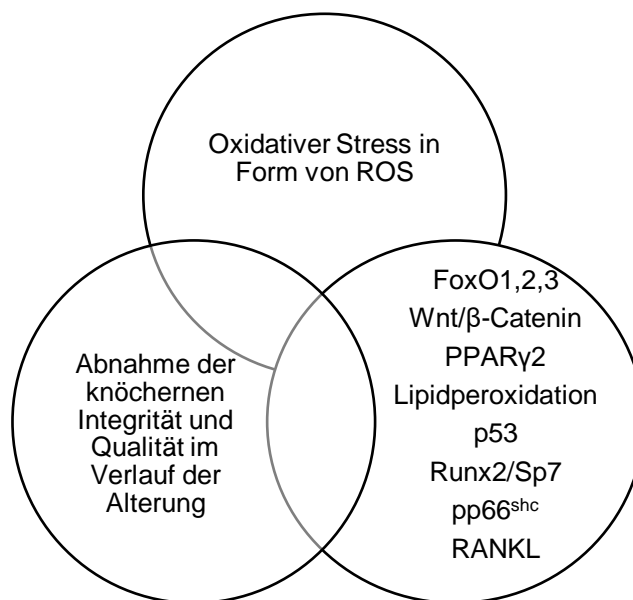


**Abbildung 6:** Differenzierung und Auswirkung von mesenchymalen Progenitorzellen [1-3].

Der Eintritt von mesenchymalen Progenitorzellen hin zu Osteoblasten ist abhängig von dem bereits oben genannten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg. Dieser ist neben seiner Rolle in der Osteoblastogenese ein starker Inhibitor der Adipogenese durch teilweise Unterdrückung der Expression von *PPAR $\gamma$ 2* (Abbildung 6) [1-3]. In Übereinstimmung dazu führt eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in den Osteoprogenitorzellen bei erwachsenen Mäusen zu einer erhöhten Expression von *PPAR $\gamma$ 2* und damit einhergehend zu einer vermehrten Knochenmarksadipositas sowie einer verminderten Knochenmasse (Abbildung 6) [1, 58].

Die bereits zuvor angesprochene lipide Peroxidation nutzt diesen Mechanismus zur Potenzierung von ROS, wodurch es im Verlauf der Alterung zu einer verminderten Knochenbildung, einer Stimulation der Osteoblasten-Apoptose und einer Inhibierung der Protein-2-induzierten Osteoblasten-Differenzierung mit einer veränderten Knochen-Morphogenität kommt [59-61]. Somit zeigt sich, dass *PPAR $\gamma$ 2* und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine zentrale Funktion in der Wirkung von oxidativem Stress in Form von ROS auf die Integrität des Knochens nehmen (Abbildung 7).

Des Weiteren ist der Verlust oder auch die Störung von mesenchymalen Progenitorzellen (MSCs) im Verlauf der Alterung durch Anhäufung von oxidativem Stress stark verbunden mit einer Störung in der Differenzierung, Proliferation und einer Zunahme der Seneszenz im Knochen [62-64]. Diese MSCs finden sich im Knochenmark sowie in perivaskulären Nischen in menschlichen Organen und sind verantwortlich für die Differenzierung in Osteoblasten; ebenso sind sie *in-vitro* in der Lage zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Abbildung 7) [1, 65].



**Abbildung 7:** Zusammenfassende Darstellung der Interaktionen von ROS-bedingten Veränderungen auf molekularer, zellulärer und gewebsspezifischer Ebene in Bezug auf die knöchernen Integrität im Verlauf der Alterung [1, 8-11].

Hinzukommend haben Studien gezeigt, dass die Vorläuferzellen gealterter Ratten im Vergleich zu jüngeren Tieren ein höheres Niveau an oxidiertem Stresslevel in Form von oxidierten Proteinen, Lipiden und einer erniedrigten antioxidativen Aktivität aufweisen [6].

Bekannt ist außerdem, dass das Tumorsuppressor-Gen p53 ein kritischer zellulärer Sensor ist, der beispielsweise auf ROS reagiert und je nach Aktivierungsgrad das Wachstum, die Reparatur, die Apoptose und die Alterung einer Zelle beeinflusst [6]. So zeigte p53 einen durch ROS-bedingten negativen Effekt auf die Osteoblastenerzeugung durch eine Repression der Expression eines wichtigen Transkriptionsfaktors der Osteoblasten-Differenzierung und der skelettalen Morphogenese, den *Runt-related transcription factor 2 (Runx2)* sowie das damit in Verbindung stehende Protein *Sp7/Osterix*, welches in der Osteoblasten-Induktion involviert ist [11, 66]. Diese Beeinflussung führt zu einer Abnahme der Osteoblasten und damit zu einer Abnahme in der Knochenmasse [11, 66].

Des Weiteren konnten E. Sahin et al. zeigen, dass die im Verlauf der Alterung durch oxidativen Stress bedingte Telomerverkürzung auch zu einer Aktivierung von p53 führt, wodurch es zu mitochondrialen Dysfunktionen mit einer Zunahme an ROS im Knochen durch eine Repression des p53-induzierten PPAR $\gamma$ -Coaktivator 1 $\alpha/\beta$ , kommen kann [50, 67].

Das Tumorsuppressor-Gen p53 ist in der Lage über verschiedene Mechanismen die ROS-Produktion zu beeinflussen, so zum Beispiel auch über eine Erhöhung der Häufigkeit des pp66<sup>shc</sup>-Proteins. Dieses Protein stellt eine Isoform des *Shc*-Proteins dar, welches eine wichtige Rolle in der Erzeugung von ROS in den Mitochondrien sowie in der Translation von oxidativen Signalen hin zur Apoptose darstellt [68]. In den Mitochondrien fungiert p66<sup>shc</sup> als Redox-Enzym, wodurch es die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verstärken kann sowie eine Förderung in der Apoptose zeigt [69]. Es stellt sich dar, dass p53- und pp66<sup>shc</sup>-negative Zellen über eine niedrigere endogene ROS-Produktion verfügen. Wodurch ein Mangel an pp66<sup>shc</sup> mit einer geringen ROS-Konzentration im Knochen, verbunden mit einer verstärkten Knochenmasse, einhergeht [70].

Des Weiteren stellen p66<sup>shc</sup>-defiziente Osteoblasten eine erhöhte Resistenz gegenüber ROS dar [8]. Insgesamt zeigt sich, dass diese beide Faktoren in der altersbedingten skelettalen Invasion durch ROS-bedingte und -abhängige Mechanismen beteiligt sind [6].

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Regulation des Knochenumbaus ist das Membranzytokin *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (RANKL) [71]. Dieses wird unter anderem von Osteoblasten sezerniert und bindet an den RANK-Rezeptor auf der Oberfläche von hämatopoetisch-osteoblastischen Vorläuferzellen, um dort die Differenzierung zu Osteoklasten zu stimulieren, wodurch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -umbau gewährleistet wird [72, 73]. Bai et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass oxidativer Stress in Form von ROS die Osteoklastogenese über eine ERK- und PKA-CREB-vermittelte Induktion, beides ROS-abhängige Regulatoren im Knochenstoffwechsel von RANKL in Osteoblastenzellen, stimuliert [71]. Diese Induktion und Stimulation führt zu einer verstärkten Osteoklastenbildung, damit einhergehenden zu einer verstärkten Knochenresorption durch die RANKL-Expression und somit zu einem Verlust an Knochenmasse [71].

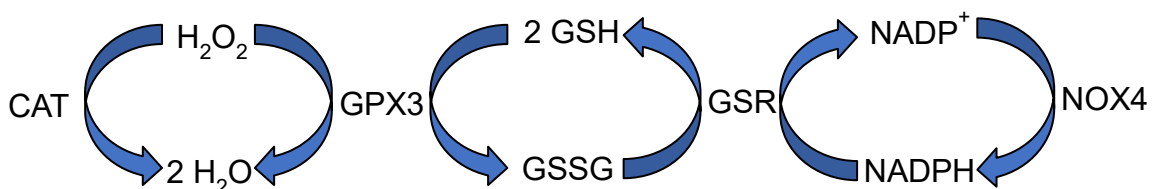
Insgesamt zeigt sich, dass ROS unter anderem die Differenzierung von Osteoklastogenese, Osteoblastogenese und Adipogenese am Knochen *in-vitro* und *in-vivo* auf molekularer, zellulärer und gewebsspezifischer Ebene auf unterschiedlichen Wegen beeinflusst, wobei viele Mechanismen noch unklar bleiben (siehe Abbildung 7) [74-76].

### **1.3 Antioxidatives System im menschlichen Körper und Antioxidantien**

Die antioxidativ wirksamen Schutzsysteme des menschlichen Körpers sind vielfältig und dienen der Reduktion der Konzentration von freien Radikalen sowie reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen und im Blutplasma des menschlichen Körpers [77]. Endogen vorkommende und natürliche antioxidative Bestandteile sind zum Beispiel Proteine wie Transferrin, Albumin, Coeruloplasmin, Hämopexin, Haptoglobin und Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD),

Glutathionperoxidase (GPX), Katalase und Vitamine wie beispielsweise Vitamin C und E [78].

Der wichtigste Vertreter und Schlüsselspieler stellt das Glutathion (GSH,  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin) dar [79]. Das atypische Tripeptid GSH ist ein zelluläres Thiol bestehend aus L-Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin [4, 80]. Es besitzt vielfältige Funktionen, vor allem fungiert es als Antioxidationsmittel bei der Beseitigung von oxidativem Stress (ROS) als Reaktionspartner für die Entgiftung körpereigener Stoffe und als Speicher sowie Transportform für den schwefelhaltigen Bestandteil Cystein [5]. Es ist ein atypisches Peptid, da es nicht im Rahmen der Translation am Ribosom synthetisiert wird, sondern durch ATP-abhängige zytosolische Synthetasen [81]. Die Synthese findet *in-vivo* in zwei aufeinanderfolgenden Schritten statt. Im ersten Schritt wird per  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Ligase (GCL) die Kondensation zwischen L-Glutaminsäure und L-Cystein katalysiert [4, 82]. Es entsteht das Dipeptid  $\gamma$ -Glutamylcystein. Diese erste Reaktion ist der limitierende und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese von GSH [83]. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe der Glutathionsynthase Glycin an das terminale Kohlenstoffatom des Dipeptids aus Glutamat und Cystein addiert und es entsteht das Tripeptid GSH [4]. Glutathion beteiligt sich an der Entgiftung von oxidativem Stress (ROS) in zwei Reaktionstypen [4]: zum einen reagiert GSH nichtenzymatisch mit Radikalen wie Stickstoffmonoxid oder Hydroxylradikalen und zum anderen fungiert es als Elektronendonator bei der Reduktion von Peroxiden durch die Glutathionperoxidase (GPX) (Abbildung 8) [4].

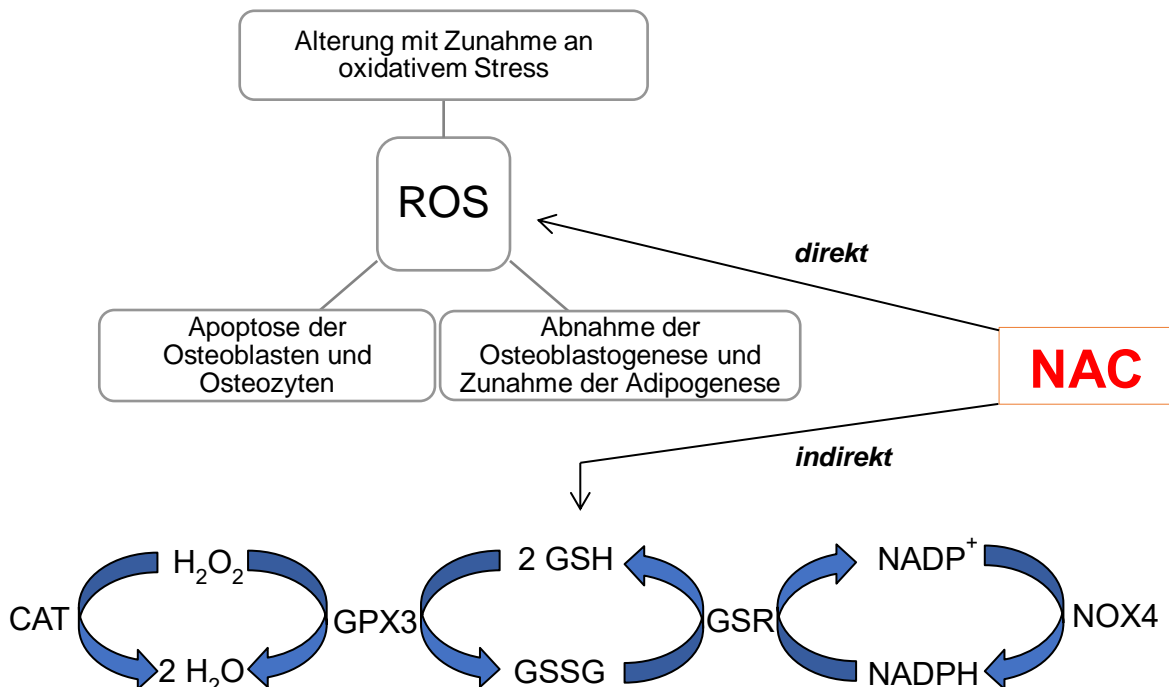


**Abbildung 8:** Wirkung und Regeneration von Glutathion mittels Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser mit Hilfe von 2 GSH durch die CAT und GP3 sowie unter Umwandlung von  $NADP^+$  zu NADPH durch GSR und NOX4 [4, 5].

Glutathiondisulfid (GSSG) stellt das Endprodukt dieser Oxidation dar und wird per Reduktion durch die Glutathionreduktase (GR) regeneriert [4]. Dieses GSSG fungiert abhängig von seiner Konzentrationshöhe als Indikator für oxidativen Stress im Körper [84].

Der schädigende Effekt von oxidativem Stress und damit an ROS, kann mit Hilfe von Ergänzungen mit antioxidativer Wirkung wie beispielweise Antioxidantien, verlangsamt oder gar verhindert werden [85]. Diese Antioxidationsmittel sind chemische Verbindungen, die eine große physiologische Funktion durch ihre Wirkung als Radikalfänger haben, in dem sie reaktive Sauerstoffspezies bekämpfen und damit verbunden den oxidativen Stress senken.

In diesem Fall wurde das Antioxidans NAC (ACC, N-Acetyl-L-Cystein) verwendet (Abbildung 9). Dies ist ein Abkömmling der natürlich vorkommenden Aminosäure Cystein. NAC erzielt seine Wirkung als Antioxidans zum einen indirekt, indem es die für die GSH-Synthese benötigte Aminosäure Cystein bereitstellt und dadurch



**Abbildung 9:** Überblick über die Interaktion zwischen ROS und seinen Implikationen auf den Knochenstoffwechsel, dem antioxidativen System in Form von Glutathion sowie die Ansatzpunkte von NAC [1, 4-7].

zur Regeneration von GSH beiträgt. Zum anderen direkt, indem es durch seine vorhandene Thiol-Gruppe oxidativen Stress in Form von ROS abfangen sowie reduzieren kann (Abbildung 9) [87, 88, 144]. NAC hat außerdem eine mukolytische, sekretolytische und sekretomotorische Wirkung, bedingt durch die Spaltung von Disulfidbrücken, die in den Mukopolysacchariden (Glykosaminoglykane, GAG) vorkommen, wodurch es ein besseres Abhusten ermöglicht [86, 87].

Des Weiteren spielt die im NAC enthaltene schwefelhaltige Aminosäure Cystein bei der Bildung und Regeneration von Glutathion eine tragende Rolle [87, 88]. Dies ist einerseits wichtig bei der Bekämpfung freier Radikale, bspw. ROS und andererseits speziell beim Abbau von Arzneimitteln wie z.B. Paracetamol durch Cytochrom P450, wobei N-Acetyl-p-benzochinonimin entsteht, welches Hepatozyten schädigt und durch Glutathion neutralisiert werden kann. Dementsprechend findet NAC bei der Paracetamol-Intoxikation klinische Anwendung [87].

Ferner findet NAC klinische Anwendung als häufiger Bestandteil in Infusionslösungen zur parenteralen Aminosäurezufuhr bei Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz, hepatischer Enzephalopathie und bei Dialysepatienten [87]. Außerhalb zugelassener Anwendungsgebiete im *Off-Label-Use* wird NAC in der Nephrologie bei der Prävention eines akuten Nierenversagens bei Risikopatienten vor Bildgebung mit KM (Kontrastmittel) eingesetzt [89].

In der Psychiatrie spielt NAC zunehmend eine Rolle durch seine Wirkung auf den Glutaminstoffwechsel, wobei es insbesondere bei Erkrankungen wie Schizophrenie, Zwangsstörungen und Depressionen derzeit experimentell in den Fokus rückt [90-92].

Weitere Ansätze und Einsatzmöglichkeiten von NAC sind in Tierversuchen untersucht worden; zum Beispiel an Mäusen konnte die Überlebensrate nach einer Malaria-Infektion gesteigert werden [93].

Außerdem konnte im Rattenmodell einer Drogentherapie gezeigt werden, dass kokainsüchtige Ratten durch NAC weniger Verlangen nach dieser Droge hatten als Kontrolltiere, denen ein Placebo appliziert wurde [94].

Bei Menschen führt NAC, auch bei Überdosierung, zu weitgehend atoxischen und wenig unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen sowie Nebenwirkungen [87]. Dennoch konnte aber gezeigt werden, dass NAC unter bestimmten Umständen, einen pro-oxidativen Effekt entfalten kann [95]. Dies ist durch die enthaltende Thiol-Eigenschaft bedingt, welche als reaktive Gruppe fungiert und somit selbst reaktiv-wirkend einhergehen kann [95]. Dieser negative Einfluss kann und sollte bei Anwendung von NAC bedacht werden. Alles in allem stellt NAC ein einfaches, günstiges, gut verfügbares, klinisch bekanntes und zugelassenes Antioxidans dar, welches in dieser Versuchsdurchführung Anwendung fand.

Alternativ zu NAC existieren weitere Substanzen und Verbindungen wie beispielsweise Quercetin und Resveratrol, aber auch etwa Grüner Tee, die alle Gegenstand der Forschung sind und in Studien zum Teil positive antioxidative Effekte gezeigt haben, jedoch noch nicht dahingehend klinisch etabliert sind wie NAC.

Quercetin als ein natürlich vorkommendes und weit verbreitetes Flavonoid in Lebensmitteln ist in der Lage den antioxidativen Stress in Form von ROS zu reduzieren. So konnten zum Beispiel Nussler et al. zeigen, dass Quercetin bei Rauchern mit erhöhten ROS-Spiegeln, das antioxidative Netzwerk mit einem erhöhten oxidativen Ungleichgewicht, durch Quercetin antioxidativ unterstützen kann [96, 97]. Wattel et al. konnten zeigen, dass Quercetin eine inhibitorische Wirkung auf die knöchernen Resorption durch Hemmung der Osteoklasten-Aktivität hat [98]. Das Resveratrol als ein Phytoalexin der Polyphenole ist ebenfalls antioxidativ wirksam [99]. *In-vitro* Studien konnten zeigen, dass Resveratrol die Osteoblastogenese stimuliert und die Adipogenese sowie Osteoklastogenese abschwächt [10, 100, 101].



Diese Wirkung von Resveratrol, der Reduktion der Adipogenese und Stimulation der Osteoblastogenese der Mesenchymzellen im Knochenmark, entsteht durch eine inhibierende Wirkung von Sirt1, ein wichtiges Enzym für Regulationsproteine und Teil der Signaltransduktion im Stoffwechsel auf PPAR $\gamma$ 2 [100]. Des Weiteren reguliert Resveratrol auch die Runx2-Genexpression über Sirt1 und FoxO3, um die Osteogenese zu fördern [101]. Bei Vorläufern der Osteoklasten verringert es durch RANKL-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Bildung von Osteoklasten [10].

Als weitere antioxidative Möglichkeit wird eine Diät und/oder Supplementierung durch Grünen Tee als Variante des Tees aufgeführt. Holzer et al. konnten zeigen, dass, insbesondere bei Rauchern, ein möglicher Nutzeffekt der knöchernen Homöostase der Frakturheilung und der Knochendichte durch Grünen Tee erzielt werden kann [36].

#### **1.4 Hitzestress im Verlauf der Alterung**

Auf molekularer Ebene forcieren erhöhte Temperaturen als ein externer Stressfaktor die Produktion an ROS und erhöhen dadurch den oxidativen Stress in einem Organismus [102]. Es konnte gezeigt werden, dass die in der Mitochondrienmembran gelegene Atmungskette ab einer bestimmten Temperatur entkoppelt wird, wodurch es zu einer Zunahme sowie einer Akkumulation an O<sub>2</sub>-• und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommt [103]. Insbesondere gealterte Menschen ab dem 65. Lebensjahr haben ein erhöhtes Risiko durch eine erhöhte periodisch einwirkende Hitze in der Mortalität [104-107].

Der Organismus verfügt über einige Adaptationsmechanismen um die physiologische Temperaturhomöostase im Gleichgewicht zu halten. Zum einen durch die Produktion und Evaporation von Schweiß ist der Organismus in der Lage, die Körperkerntemperatur zu regulieren, zum anderen durch eine Vasodilatation mit einer Blutumverteilung von zentral nach peripher, verbunden mit einer Zunahme des Blutflusses [108]. Des Weiteren reagiert der Organismus bei extremen Bedingungen wie beispielsweise Hyperthermie mit der Produktion von sogenannten *Heat Shock Proteins* (HSP, Hitzeschockproteinen),

welche anderen Proteinen bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur helfen, um sie so vor einer Denaturierung zu schützen [103, 109].

Außerdem reagiert der Organismus mit einer Zunahme an GSH-Produktion, um den entstandenen oxidativen Stress in Form von ROS abzupuffern [102]. Yang et al. konnten zeigen, dass die akute Hitze-Exposition die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette verringert, wodurch es zu einer Überproduktion an ROS, verbunden mit einer vermehrten lipiden Peroxidation und einer Zunahme an oxidativem Stress in den Zellen kommt [110]. Dieser oxidative Stress in Form von ROS durch erhöhte Temperaturen führt zu Schäden des Knochengewebes, deren Ausmaß von der Höhe der Temperatur und der Dauer der Exposition abhängig ist [111]. Die Schwelle des Auftretens für morphologische Knochengewebsschäden liegt bei ca. 40-47°C für 1 Minute, wobei länger andauernde und höhere Temperaturen zu einer weiteren irreversiblen Schädigung der Knochenstruktur mit anschließender Resorption und bindegewebigem Umbau führen [112].

Insgesamt führt Hitzestress zu einer Verlagerung des antioxidativen Systems hin zu einem vermehrten oxidativen Stress-Niveau bei verstärkter ROS-Produktion, verbunden mit einem geschwächten mitochondrialen-antioxidativen Schutzsystem [103].

### **1.5 Ziel des Projekts**

Das Ziel des Projekts war es, den Einfluss von oxidativem Stress und die zugrundeliegenden Mechanismen und deren Folgen für die Alterungsprozesse im menschlichen Knochen anhand eines Tiermodells zu untersuchen, da diese Mechanismen und Abläufe bis heute noch nicht vollständig geklärt sind [141]. Zusammenfassend zeigen die Erkenntnisse aus verschiedenen Studien, wie zuvor beschrieben, dass oxidativer Stress in Form von ROS eine wichtige Rolle in Alterungsprozessen spielt [38, 40, 43, 44]. Ein besseres Verständnis dieser ROS-bedingten Veränderungen auf molekularer, zellulärer und gewebes-

spezifischer Ebene könnte die Erkenntnisse zur oxidativen Zellschädigung erweitern, denn oxidativer Stress scheint ein wichtiger Mechanismus zur altersbedingten skelettalen Integrität auf das Zellnetzwerk des Knochens darzustellen [1, 6, 79].

Etwa auf zellulärer Ebene kann oxidativer Stress und somit ROS die Osteoblastogenese vermindern, bei gleichzeitig verstärkter Osteoklastenaktivität und zunehmender Adipogenese [9, 100]. Ferner könnten dabei potentielle Zielstrukturen für die Beeinflussung von Alterungsprozessen identifiziert werden [12, 113]. Des Weiteren führt die Seneszenz des Knochens zu einem altersabhängigen Knochenverlust mit Veränderungen der knöchernen Stabilität und der skelettalen Integrität [1, 62].

Basierend auf einem Wistar-Ratten-Tier-Modell mit 3 Altersgruppen mit Kontrollgruppe, unter dem Einfluss von oxidativem Stress mittels Hitzestress-Behandlung und unter Gabe von NAC als Antioxidans, ist das Ziel der vorliegenden Dissertation:

1. zu analysieren, wie sich die knöcherne Integrität über den Verlauf der Alterung verändert, also die durch Seneszenz bedingten Veränderungen am Knochen darzustellen.
2. aufzuzeigen, welchen Einfluss Hitze und dadurch bedingt oxidativer Stress auf den Knochen im Verlauf der Alterung hat.
3. zu analysieren, welchen altersabhängigen, anti-oxidativen Effekt NAC als Antioxidans auf die Knochenstruktur und die Stabilität über den Verlauf der Alterung darstellt.

Die Charakterisierung und Untersuchung der knöchernen Integrität erfolgte dabei mittels biomechanischer Analyse zur Knochenstabilitätsmessung und Mikro-Computertomographie zur Analyse struktureller Veränderungen im Knochen.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Tiere

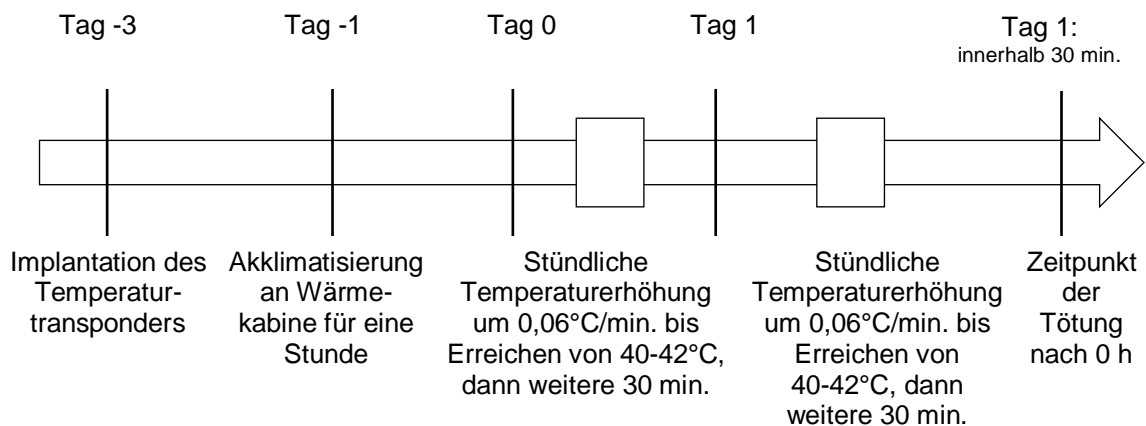
Die Wistar Ratten drei verschiedener Altersgruppen (juvenil: 8 Wochen; adoleszent: 6-7 Monate; seneszent: 23 Monate) wurden vom Janvier Labor (Le Genest-st-isle, Frankreich) erworben. Die Tiere wurden in einer Temperaturkontrollierten (20-24°C) Tierhaltung sowie bei einem 12 h Licht-/12 h Dunkelheit-Rhythmus gehalten. Futter (ssniff R/M-H, 10 mm) und Wasser standen ad libitum den Tieren während der Studie zur Verfügung. Die Experimente begannen nach einer Akklimatisierungsperiode von einer Woche und alle experimentellen Abläufe sowie Versuche wurden durch einen Kooperationspartner (Pharmacelsus, GmbH, Saarbrücken, Deutschland) und im Einverständnis und in Übereinstimmung mit der lokal zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen; Saarbrücken, Ordnernummer C1 2.4.2.2 Nr. 12/2012) durchgeführt. In Tabelle 1 ist ein Überblick über die verschiedenen Altersgruppen und die Einteilung der Hitzestress-Behandlung sowie der NAC-Behandlung dargestellt.

<b>Wistar-Ratten</b>	<b>Alter</b>	<b>Gesamt n:</b>	<b>Kontrolle n:</b> Ø NAC Ø Hitze	<b>Hitzestress n:</b> Ø NAC	<b>NAC n:</b> + Hitze
<b>Juvenil</b>	8 Wochen	12	12	-	-
<b>Adoleszent</b>	6/7 Monate	29	7	10	12
<b>Seneszent</b>	23 Monate	30	9	8	13

**Tabelle 1:** Überblick über die Anzahl (n) der verschiedenen Altersgruppen und Behandlungen (Alle Versuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen, Saarbrücken, Ordnernummer C1 2.4.2.2 Nr. 12/2012, genehmigt).

## 2.2 Behandlung mit Hitzestress

Um die Veränderungen im antioxidativen System in einer akuten Stresssituation zu analysieren, wurden die adoleszenten und seneszenten Tiere dem Hitzestress ausgesetzt. Diese Methodik stützt sich auf ein etabliertes Protokoll von Zhang et al. [114]. Ein Temperaturtransponder (IPTT-300, Plexx B.V., The Netherlands) wurde 3-5 Tage bevor die eigentliche Hitzestress-Behandlung begann den Tieren subkutan in den Nacken unter Inhalationsnarkose mit Isofluran implantiert. 3-5 Tage nach der Implantation wurde die Hitzestress-Behandlung begonnen. Einen Tag vor der Hitzestress- Applikation fand eine Akklimation der Tiere in den vorgesehenen Wärmekabinen (Kleintierkammer, Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) ohne Hitze dabei zu applizieren für eine Stunde statt, um andere Stressfaktoren zu minimieren. An den darauffolgenden Tagen wurde die Temperatur der Wärmekabinen mit einer Rate von 0,06°C/min. für exakt 60 min. erhöht, bis die Körperkerntemperatur der Tiere 40-42°C erreichte. Im Anschluss wurde diese Temperatur unter fünfminütiger Kontrolle des Transponders für weitere 30 min. gehalten. Diese Prozedur wiederholte sich 24 Stunden später (Abbildung 10).



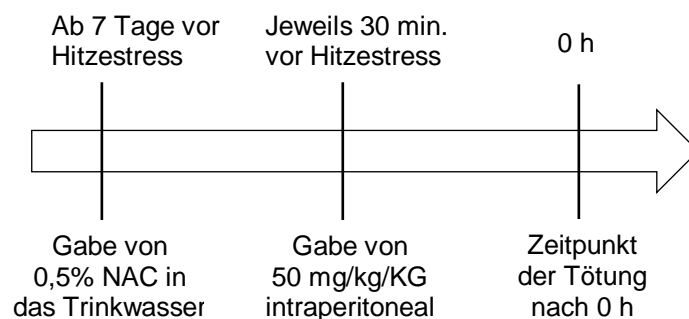
**Abbildung 10:** Graphische Darstellung des Verlaufs der Behandlung mit Hitzestress.

Während der Hitzestress-Behandlung erhielten die Ratten weder Futter noch Wasser. Die Tiere wurden durch eine Isofluran-Überdosierung nach 0 Stunden, also direkt nach der Hitzestress-Behandlung, im Anschluss an die zweite Hitzestress-Behandlung getötet und per kardialer Punktur entblutet. Dann wurde das Serum vorbereitet, die Leber entnommen sowie der Unterleib abgetrennt,

kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Die Unterleiber wurden dem Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung in Tübingen zur weiteren Präparation und knöchernen Aufarbeitung zur Verfügung gestellt.

### **2.3 Behandlung mit N-Acetyl-L-Cystein**

Die Tiere wurden mit N-Acetyl-L-Cystein (NAC, ACC) vorbehandelt, um die Effekte dieses Antioxidans auf die Veränderungen im antioxidativen System zu untersuchen. Ausschließlich adoleszente und seneszente Ratten wurden für diese Behandlung verwendet. Die juvenilen Tiere dienten als Kontrollgruppe. Außerdem wurden die Tiere, die mit NAC vorbehandelt waren, ebenfalls dem Hitzestress ausgesetzt. Als Kontrollgruppe wurden einige Ratten in die Wärmekabinen gesetzt, jedoch keinem Hitzestress ausgesetzt. 0,5% NAC wurde in das Trinkwasser sieben Tage vor dem ersten Hitzestress bis zur Tötung hinzugegeben. Zusätzlich wurden 50 mg/kg Körpergewicht (KG) des NAC intraperitoneal 30 min. vor jeder Hitzestress-Behandlung injiziert (Abbildung 11).

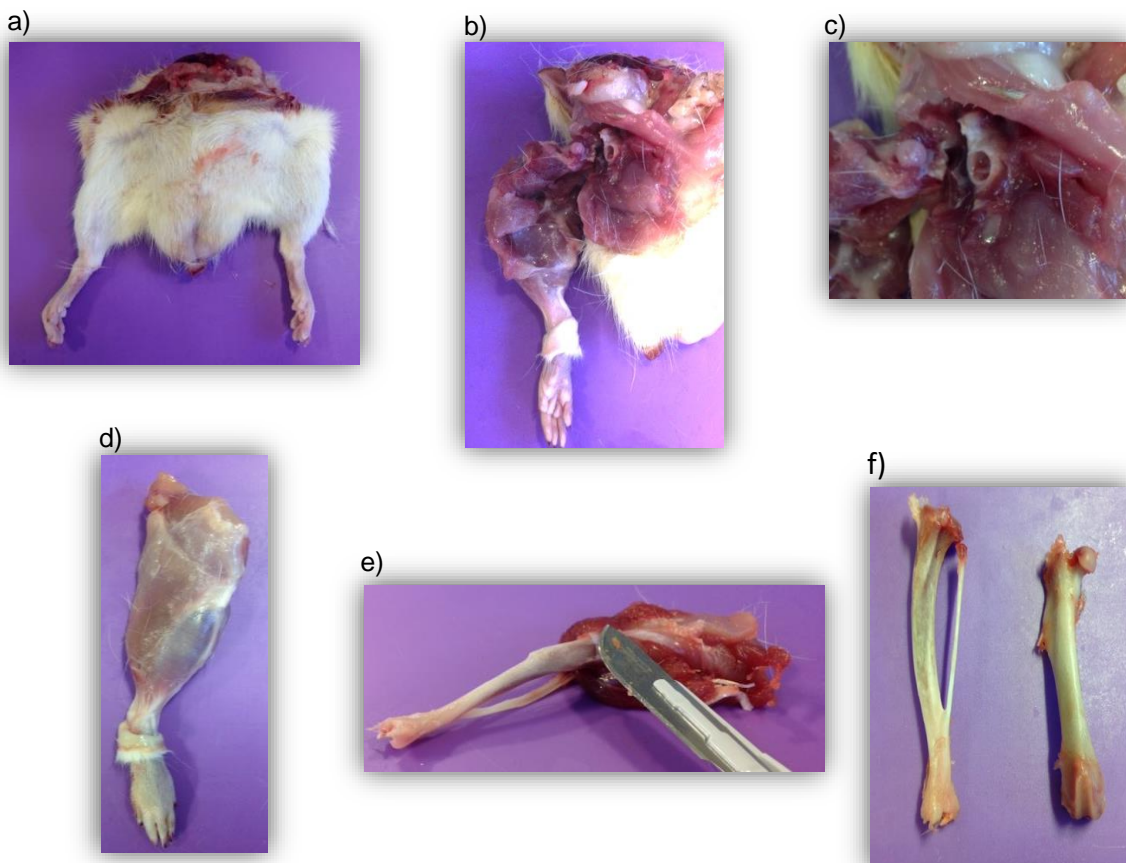


**Abbildung 11:** Graphische Darstellung des Verlaufs der Applikation von NAC als Antioxidans.

### **2.4 Präparation des Unterleibs der Wistar-Ratten**

Die Rattenpräparation wurde an der unteren Extremität (Extremitas inferior) der Tiere zur Darstellung der Femura sowie Tibiae und Fibulae durchgeführt (Abbildung 12). Zu Beginn wurde per Schere die Haut im und über dem Oberschenkelbereich in zirkumferenter Weise umschnitten und freigesetzt.

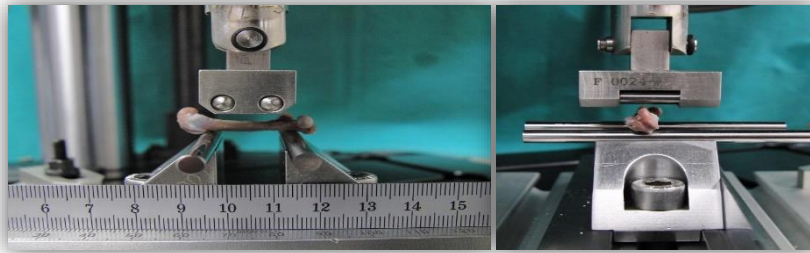
Im Anschluss wurde diese freigesetzte Haut nach distal über den Tendo calcaneus bis zum Tuber calcanei abgezogen und das Caput femoris aus dem Acetabulum exartikuliert, wodurch die Extremitas inferior, das Art. coxae, abgesetzt werden konnte. Im Folgenden wurde der sich am knöchernen Skelett befindende muskuloskeletale Apparat wie Muskeln, Ligamenta etc. entfernt. Zuvor wurde der Halteapparat um das Art. genus und Art. talocruralis präpariert, um Oberschenkel von Unterschenkel sowie Unterschenkel vom oberen Sprunggelenk (OSG) zu separieren, um so die einzelnen Knochen darstellen zu können. Nach Präparation der muskulären wie ligamentären Bestandteile konnten die einzelnen Knochen säuberlich und frei dargestellt werden, zum einen das Femur, zum anderen die Tibia und die Fibula. Zum Schluss wurden alle Knochen in sogenannten *Falcon-Tubes* (größere Mikroreaktionsgefäße) gelagert, beschriftet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.



**Abbildung 12:** a) Darstellung des Unterleibs einer Wistar-Ratte. b) Exartikulierter Caput femoris aus dem Acetabulum mit einer vergrößerten Ansicht in c). d) Abgesetzte Extremitas inferior. e) Präparation des muskuloskeletalen Apparats. f) Darstellung der sauber und frei präparierten Knochen: Tibia und Fibula links sowie Femur rechts.

## 2.5 Biomechanische Stabilitätsmessung [115]

Die biomechanische Stabilitätsmessung wurde im *AO Research Institute* in Davos (Schweiz) durchgeführt. Dafür wurden die Femura nach ihrer Dissektion in zwei Gruppen aufgeteilt und mindestens 20 min. aufgetaut, um sie bei Raumtemperatur zu testen. Die Knochen wurden während des Auftauens in Salin-getränkten Kompressen feucht gehalten und unter stabiler Lage getestet.



**Abbildung 13:** Darstellung der biomechanischen Stabilitätsmessung mit 4-Punktbiegetest.

Die biomechanische Testung wurde unter Benutzung einer MTS-Acumen-Testmaschine mit *3kN load cell* durchgeführt. Der Testaufbau bestand aus einem 2-teiligen 4-Punktbiegetest [115]. Der Abstand der statischen Auflagepunkte betrug 20 mm und der beiden mittig liegenden von oben kommenden Druckpunkte 10 mm (Abbildung 13 und 14). Der untere Anteil wurde auf einer Ladungsrahmenplatte fixiert, der obere Anteil des Testaufbaus enthielt ein



**Abbildung 14:** Darstellung verschiedener, im 4-Punktbiegetest gebrochener, Knochen.



Gelenk am Maschinenquerhaupt mit gemeinsamer Zulassung für die Strecktesteinteilung. Die Einzelprobe (Femur) wurde auf der Auflage mit der dorsomedialen Seite nach oben platziert. Das Loading wurde mit konstanter Transversengeschwindigkeit von 1 mm die Minute bis zum Ausfall der Einzelproben (Knochenbruch) durchgeführt. Die axialen Kraft/Druck- und Verschiebungsdaten wurden durch eine Frequenz von 100 Hz ermittelt. Die erfassten Parameter waren *ultimate strength* (= *peak force*), *displacement at max. load*, *stiffness* und *maximum bending moment* [115].

## **2.6 Computertomographie – $\mu$ CT Analyse [116, 117]**

Die präparierten Femura wurden nach ihrer Dissektion im Werner Siemens Imaging Center Tübingen, per *35- $\mu$ m isotropic voxels* mit Hilfe einer Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT, Siemens Inveon MultiModality SPECT/CT) anhand ihrer trabekulären und kortikalen Parameter eingescannt und gemessen (Abbildung 15, 16 und Tabelle 2). Durch das *Inveon-Research-Workplace* und die *3D-Visualization-Software* des Werner Siemens Imaging Center Tübingen erfolgte die Analyse und Auswertung der Knochen (Abbildung 16 und 17). Um alle eingeladenen Knochendaten darstellen und bearbeiten zu können, mussten initial alle Datensätze geöffnet und vom Bildumfang auf ein Minimum zurecht-

### **Abbildung 15:**

Siemens-Inveon-MultiModality-SPECT/CT des Werner Siemens Imaging Center zu Tübingen, in welchem die Knochen eingescannt und analysiert wurden. Mit Hilfe dieses Kleintier-Scanners kann die Knochendichte von Proben bestimmt werden [116, 117]. Alle weiteren Geräte-Eigenschaften sowie Einstellungen laufen über den Hersteller Siemens Healthcare GmbH.



geschnitten werden, so dass ein reines Bild des Knochens ohne umgebenden luftleeren Raum vorzufinden war (Abbildung 17). Dies war notwendig, um eine saubere und zügigere Bearbeitung der Knochen zu ermöglichen.

<b>Rekonstruierte Pixelgröße</b>	43.243 x 43.243 x 43.243 $\mu\text{m}^3$
<b>Spannung und Strom der Röntgenquelle</b>	80 kVp und 500 $\mu\text{A}$
<b>Gesichtsfeld</b>	axial 44.33 mm, transaxial 66.50 mm
<b>Rotation</b>	360° Rotation, 360 Rotationsschritte
<b>Komprimierungsfaktor</b>	Vergrößerung 2, medium-low

Tabelle 2: Technische Parameter der Mikro-Computertomographie.

Zu Beginn der Messungen wurde die Länge aller Femura im *Inveon-Research-Workplace* ausgemessen. Dazu wurde ein grüner *Cursor* im Programm in allen Ebenen axial/koronal/sagittal mittig eingestellt und mit Hilfe des internen Lineals im Image-Menü ausgemessen.



Abbildung 16: Darstellung eines eingescannten Knochendatensatzes und b) eingescannte Knochenpaare im Inveon-Research-Workplace-Programm.

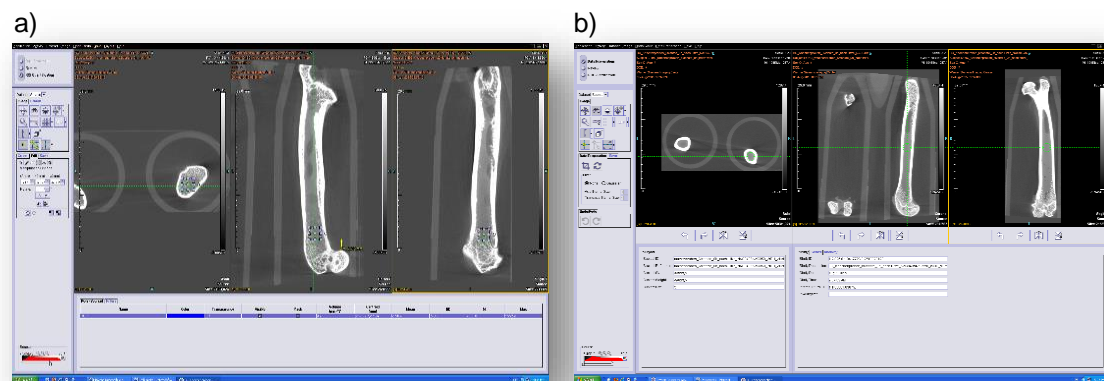


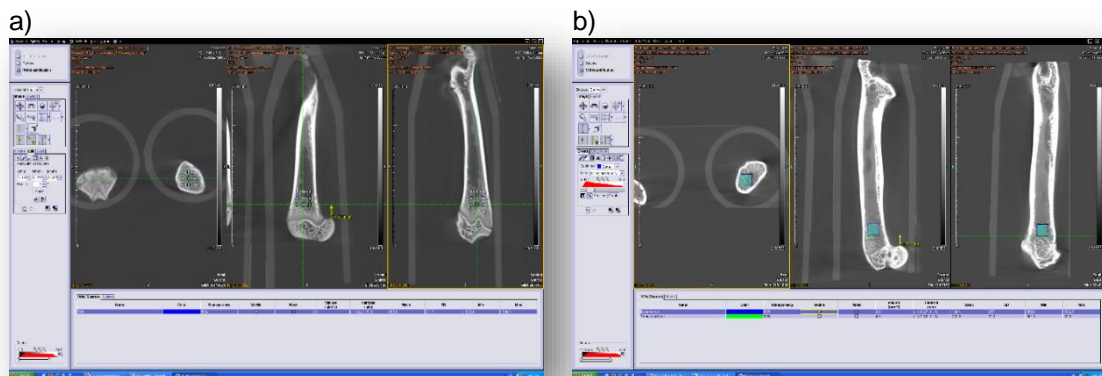
Abbildung 17: a) Beispielhafte Darstellung eines nicht-zurechtgeschnittenen Knochenpaares (Femura) im Inveon-Research-Workplace in axialer, koronaler und sagittaler Schichtung und b) zurechtgeschnittener Datensatz im Vergleich.

Hierfür wurden die zuvor entferntest festgelegten Knochenpunkte proximal vom Caput femoris und Trochanter major bis zum distalen Ende des Condylus lateralis et medialis femoris, ausgemessen. Die Längenmessungen wurden immer in der sagittalen Schichtung durchgeführt, da in diesem Schnitt die volle Länge des Knochens besonders gut dargestellt werden konnte (Abbildung 18). Im nächsten Schritt musste ein Vorlagenwürfel (*template cube*) erstellt werden, welcher in den trabekulären Anteil aller Knochen passte, ohne dabei die Kortikalis des Knochens zu tangieren. Somit musste jeder Knochen auf Stellung und Passform des Vorlagenwürfels überprüft und die Größe des *template cube* gegebenenfalls adaptiert werden. Hinzukommend wurde dieser Vorlagenwürfel in jedem neu geöffneten Datensatz jeder Femura an der gleichen ausgemessenen und vorgesehenen Stelle platziert. Durch mehrere Versuche und Erprobungen ergab sich, dass der Vorlagenwürfel distal (jedoch proximal, respektive kranial, der Epiphysenfuge, wenn vorhanden bei juvenilen Knochen) im trabekulären Bereich, wie oben beschrieben, eingesetzt werden musste. Dabei wurde eine bestimmte Höhe mit Hilfe eines vertikalen (gelben) Positionspfeiles gewählt, immer ausgehend vom höchsten Punkt der Condylus lateralis et medialis femoris, welcher zuvor ebenfalls beim Testeinsetzen des Vorlagenwürfels in jedem einzelnen Knochen bestimmt wurde. Ausschlaggebende Kriterien waren, dass es zu keiner Überschneidung mit der kortikalen Struktur des Knochens kommt, ansonsten wäre diese als trabekuläre Struktur vom Programm mitberechnet worden. Es musste also ein gleichmäßiger Abstand zur Epiphysenfuge und ein gut passender sowie darstellbarer trabekulärer Anteil des



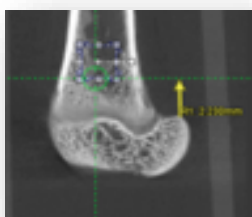
**Abbildung 18:** Längenmessung in sagittaler Ebene mit zentral gelegenem grünen Cursor und sagittal platziertem internen Lineal.

Knochens im Bereich der Metaphyse gewählt werden, da dort primär spongiöser, also trabekulärer Knochen vorlag. Zum genauen Einsetzen des Vorlagenwürfels wurde von dem oben beschriebenen vertikalen (gelben) Positionspfeil eine horizontal (grün) gestrichelte *Cursor*-Linie geschaffen, auf welcher der Würfel platziert werden konnte (Abbildung 19 und 20).



**Abbildung 19:** a) Darstellung des in den trabekulären Bereich des Knochens eingesetzten Vorlagenwürfels mit Hilfe des grünen und gelben Cursors ohne dabei die Kortikalis zu tangieren. b) Eingesetzter Vorlagenwürfel mit Zuordnung der farblichen ROIs des trabekulären und intertrabekulären Anteil des Knochens.

Nach Durcharbeitung aller Knochen ergab sich schließlich ein Vorlagenwürfel von  $9 \text{ mm}^3$  und eine Höhe des vertikalen (gelben) Positionspfeiles von 2,2 mm. Mit Hilfe des erstellten und angepassten Vorlagenwürfels konnten nun die von ihm eingegrenzten knöchernen Strukturen mit Hilfe des *Inveon-Research*-Programms farblich markiert dargestellt, unterschieden und zugeordnet werden. Zum einen wurde der trabekuläre Anteil, der *TrabecularBone*, und zum anderen der intertrabekuläre Anteil, der *BoneMarrow*, farblich zugeordnet, indem diesen Anteilen die sogenannten *Regions of Interest* (ROI) zugewiesen wurden (Abbildung 19, 20 und 21). Diese Zuordnung fand statt, damit das Programm mit



**Abbildung 20:** Ausschnitt des Bereiches in den der Vorlagewürfel eingesetzt wurde. Dieser wurde anhand des gelben sowie grünen Cursors im trabekulären Bereich proximal der Epiphysenfuge platziert.

Hilfe der farblichen Unterscheidung die einzelnen Regionen differenzieren konnte. Die Zuordnung und Durchführungsschritte erfolgten mit *Create, Perform ROI thresholding* und *Invert threshold range*. Dies wurde bei jedem einzelnen Knochendatensatz durchgeführt und abgespeichert. Die zuvor abgespeicherten Knochendatensätze wurden im *3D-Visualization-Program* per *Import ROIs* eingespeist und über *BoneMorphometry + Compute* die Parameter erhoben und dargestellt (Abbildung 21). Die Parameter beinhalteten das trabekuläre Knochenvolumen als Prozentangabe des Gesamtvolumens (*BoneVolume/TotalVolume*, BV/TV, %), die Knochenoberflächendichte (*BoneSurface/BoneVolume*, BS/BV,  $\text{mm}^{-1}$ ) und die Dicke der Trabekel (*TrabecularThickness*, Tb.Th, mm). Außerdem wurden die Trabekelanzahl (*TrabecularNumber*, Tb.N, 1/mm), der Trabekelabstand (*TrabecularSpacing*, Tb.Sp, mm) und das trabekuläre Muster (*TrabecularPatternFactor*, Tb.Pf,  $\text{mm}^{-1}$ ) als Ausdruck für konkave (negative Werte) und konvexe (positive Werte) Strukturen, bestimmt. Der *TrabecularPatternFactor* stellt dabei das trabekuläre Muster dar, wobei die Beziehung von konvexer zur konkaven Oberfläche betrachtet wird. Dabei spiegeln konkave Flächen ein stabiles Trabekelwerk im Knochen wider [118, 119]. Zur Berechnung werden zwei Messungen von Knochenfläche (A1, A2) und Knochenperimeter (P1, P2) durchgeführt [118, 119]. Der Quotient der Differenz aus der ersten und der zweiten Messung bestimmt dann den *TrabecularPatternFactor* ( $\text{Tb.PF} = (P1-P2)/(A1-A2)$ ) [118, 119].



**Abbildung 21:** Geöffneter Knochendatensatz im 3D-Visualization-Programm mit berechneten Parametern.

## **2.7 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism 7.03* durchgeführt. Jegliche Unterschiede entlang der Signifikanz der Gruppen wurde durch einen *ANOVA-Test* mit Hilfe eines ungepaarten *T-Tests* und einem *F-Test* zum Vergleich der Varianz getestet und durchgeführt. Das Limit der Signifikanzen lag bei  $*p < 0.05$  sowie  $**p < 0.01$  und  $***p < 0.001$ . Bei nicht explizit markierten Signifikanzen lagen diese nicht vor. Als statistische Darstellung der Graphiken wurden Streudiagramme mit Balken (*Scatter plot with bar*) und zur besseren Darstellung in Abb. 38 ein Streudiagramm ohne Balken (*Scatter plot without bar*) gewählt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Veränderung der knöchernen Integrität im Verlauf der Alterung

##### 3.1.1 Effekt der Alterung auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT

Um die Veränderungen und den Effekt der Alterung in Bezug auf die knöcherne Integrität an standardisierter Position des Knochens zu analysieren, wurden, nachdem die Knochen präpariert waren, mikrocomputertomographische Verfahren wie oben beschrieben, genutzt und verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der reinen Knochenalterung ohne Hitzestress-Behandlung (-H) und ohne NAC-Zugabe (-NAC) graphisch dargestellt, wobei 8 W (Wochen) für das juvenile Alter, 6/7 M (Monate) für das adoleszente Alter und 23 M (Monate) für das seneszente Alter der Ratten steht. Die Interessensparameter der Mikro-Computertomographie sind hinzukommend zur Längenmessung in Tabelle 3 abgebildet.

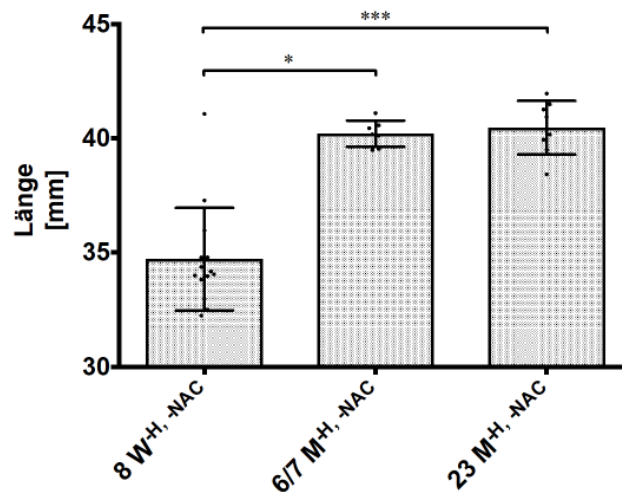
<u>Trabekulärer Knochen:</u>	<u>Kortikaler Knochen:</u>
BoneVolume/TotalVolume	BoneVolume/TotalVolume
BoneSurface/BoneVolume	BoneSurface/BoneVolume
TrabecularThickness	CorticalVolume
TrabecularNumber	
TrabecularSpacing	
TrabecularPatternFactor	

**Tabelle 3:** Interessensparameter der Mikro-Computertomographie

##### 3.1.2 Länge der Femura

Zuerst wurde eine Längenmessung der Femura der Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 34.72, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 40.2 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 40.46. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 6/7 Monaten sowie zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten hat sich eine Signifikanz gezeigt.

Die Längenmessungen der Femura der verschiedenen Altersgruppen der Tiere spiegelt somit eine signifikante Längenzunahme im Verlauf der Alterung vom juvenilen hin zum adoleszenten und seneszenten Knochen wider. Es zeigt sich somit, dass die juvenilen Knochen signifikant kleiner sind als die adoleszenten und seneszenten Knochen.



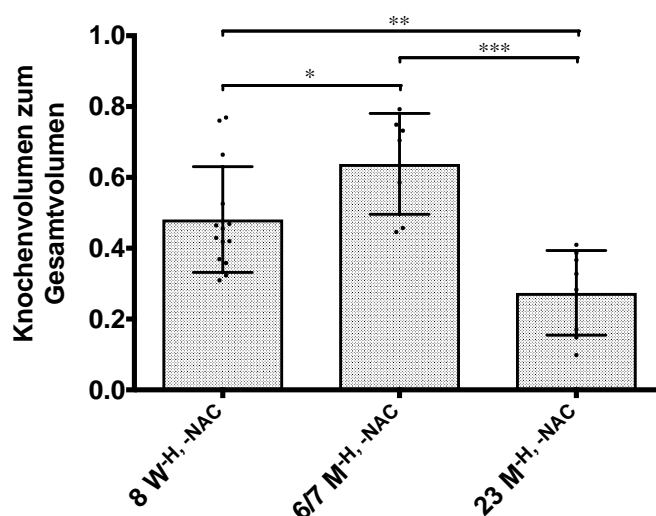
**Abbildung 22: Darstellung der Femurlängen.** Längenmessung der Oberschenkelknochen der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit einer deutlichen Längenzunahme im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 34.72 (8 W), 40.2 (6/7 M), 40.46 (23 M).

### 3.1.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen

Die Ergebnisse des Knochenvolumens zum Gesamtvolumen (*BoneVolume/TotalVolume*, BV/TV) sind in Abbildung 23 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.48, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 0.63 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 0.27. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 6/7 Monaten zeigt sich ein signifikanter Anstieg des BV/TV. Im Gegensatz dazu nimmt dies zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 6/7 Monaten,



verglichen zur Altersgruppe mit 23 Monaten, signifikant ab. Ergänzend zeigt sich eine signifikante Abnahme des BV/TV zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten. Zusammenfassend nimmt das Knochenvolumen zum Gesamtvolumen im Verlauf der Alterung bei den seneszenten Tieren ab. Die adoleszenten Knochen zeigen im Vergleich zu den juvenilen und seneszenten Knochen deutlich mehr Knochenvolumen zum Gesamtvolumen.

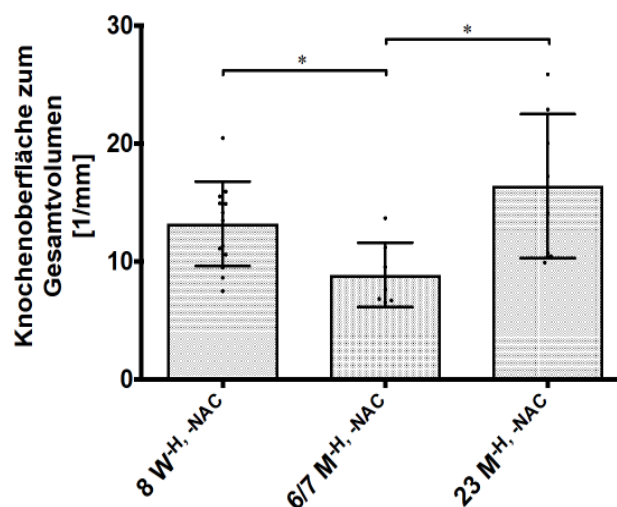


**Abbildung 23: Darstellung der Knochenvolumina.** Knochenvolumen zum Gesamtvolumen der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit Abnahme des knöchernen Volumens im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen der Altersgruppe 8 Wochen und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor. Zwischen der Altersgruppe von 6/7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 0.48 (8 W), 0.63 (6/7 M), 0.27 (23 M).

### 3.1.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen

In Abbildung 24 ist die Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen (*BoneSurface/BoneVolume*, BS/BV) dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 13.2, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 8.88 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 16.4. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen und

der mit 6/7 Monaten des BS/BV. Des Weiteren kommt es zu einem signifikanten Anstieg zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten. Folglich nimmt die Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen vom juvenilen Knochen hin zum adoleszenten Knochen signifikant ab, wohingegen es vom adoleszenten Knochen zum seneszenten Knochen hin signifikant ansteigt. Zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten liegt eine Tendenz in der Zunahme des BS/BV vor.

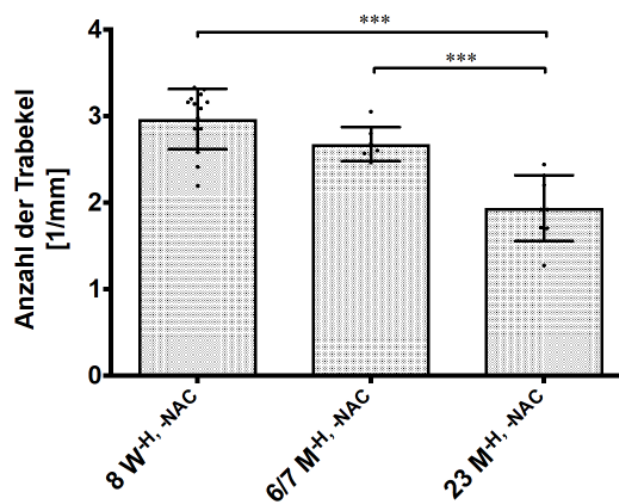


**Abbildung 24: Darstellung der Knochenoberfläche.** Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit einer Abnahme zwischen den juvenilen und adoleszenten Ratten sowie einer Zunahme hin zu den seneszenten Tieren. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 13.2 (8 W), 8.88 (6/7 M), 16.4 (23 M).

### 3.1.5 Anzahl der Trabekel

Die Veränderung der Anzahl der Trabekel (*TrabecularNumber*, Tb.N) im Verlauf der Alterung in den verschiedenen Altersgruppen ist in Abbildung 25 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 2.96, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 2.67 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 1.93.

Im Vergleich zu den Altersgruppen mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten liegt eine Signifikanz vor. Bei den Altersgruppen von 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten liegt im Vergleich ebenfalls eine Signifikanz vor. Es zeigt sich somit, dass im Verlauf der Alterung die Anzahl der Trabekel, die trabekuläre Struktur, respektive die eng vernetzte trabekuläre Gliederung abnimmt. Folglich verfügt der juvenile Knochen über ein dichtes Netz an trabekulärer Struktur, welches im Verlauf der Alterung signifikant abnimmt.

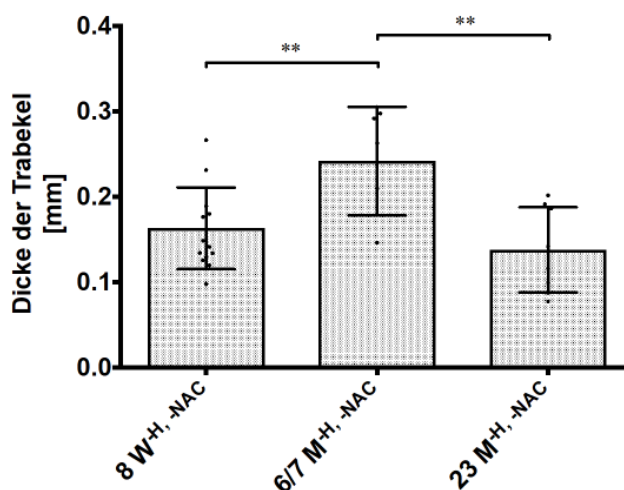


**Abbildung 25: Darstellung der Trabekelanzahl.** Anzahl der Trabekel der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit einer Abnahme der trabekulären Struktur im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 2.96 (8 W), 2.67 (6/7 M), 1.93 (23 M).

### 3.1.6 Dicke der trabekulären Struktur

In Abbildung 26 ist die Dicke der Trabekel (*TrabecularThickness*, Tb.Th) im Verlauf der Alterung in den verschiedenen Altersgruppen aufgezeigt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.16, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 0.24 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 0.13. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 6/7 Monaten zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Dicke der trabekulären Struktur.

Wohingegen sich zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten eine signifikante Abnahme ergibt. Es wird somit sichtbar, dass die Dicke der trabekulären Struktur im Verlauf der Alterung bei den seneszenten Tieren abnimmt. Der adoleszente Knochen hingegen verfügt über ein dickes trabekuläres Netzwerk.

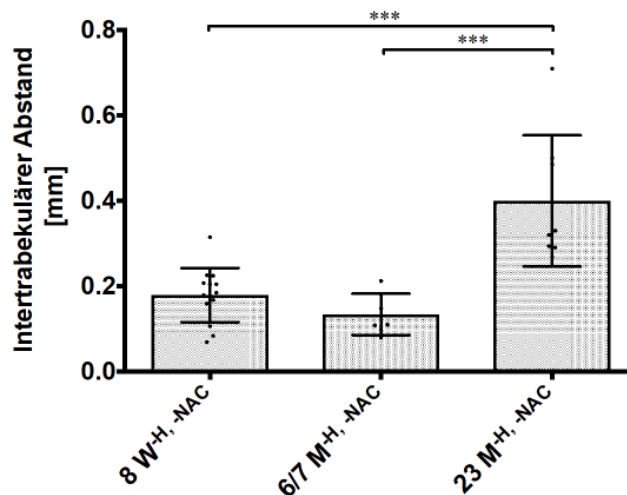


**Abbildung 26: Darstellung der Trabekeldicke.** Dicke der Trabekel der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit abnehmender trabekulärer Struktur im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 0.16 (8 W), 0.24 (6/7 M), 0.13 (23 M).

### 3.1.7 Abstände zwischen den Trabekeln

Der intertrabekuläre Abstand (*TrabecularSpacing*, Tb.Sp) im Verlauf der Alterung in den verschiedenen Altersgruppen ist in Abbildung 27 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.17, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 0.13 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 0.39. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten zeigt sich eine signifikante Zunahme der Abstände zwischen den trabekulären Strukturen. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten zeigt sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Abstände zwischen den Trabekeln.

Es zeigt sich somit, dass der Abstand der trabekulären Strukturen im Verlauf der Alterung zunimmt und sich somit auch der intertrabekuläre Bereich, das heißt die eng vernetzte Spongiosa, an Dichte verliert und auflockert. Dies passt zu den zuvor genannten Ergebnissen aus Abbildung 23 und 24, welche eine Abnahme in der Anzahl (vgl. Abb. 23) und in der Dicke (vgl. Abb. 24) der trabekulären Struktur widerspiegeln. Übereinstimmend zur Abbildung 25 ergibt sich ebenfalls eine Zunahme im intertrabekulären Bereich. Denn durch ein qualitativ und quantitativ aufgelockertes trabekuläres Netzwerk kommt es zu vergrößerten Abständen zwischen den Trabekeln.

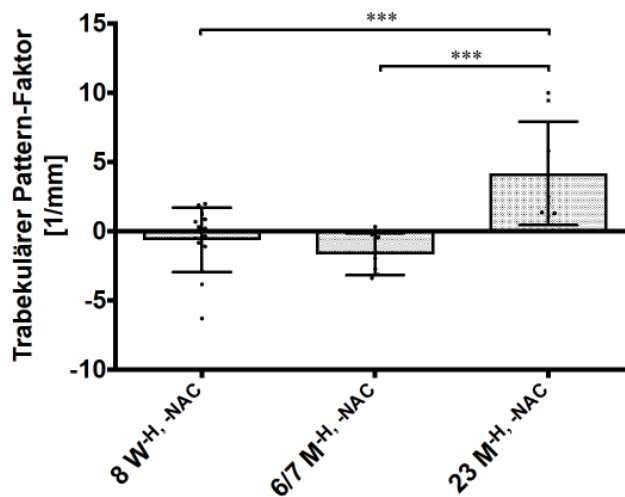


**Abbildung 27: Darstellung der Trabekelabstände.** Abstände zwischen den Trabekeln der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit zunehmenden Abständen im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 0.17 (8 W), 0.13 (6/7 M), 0.39 (23 M).

### 3.1.8 Trabekulärer *Pattern*-Faktor

In Abbildung 28 ist der Trabekuläre *Pattern*-Faktor (*TrabecularPatternFactor*, Tb.Pf) im Verlauf der Alterung in den verschiedenen Altersgruppen dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei -0.61,

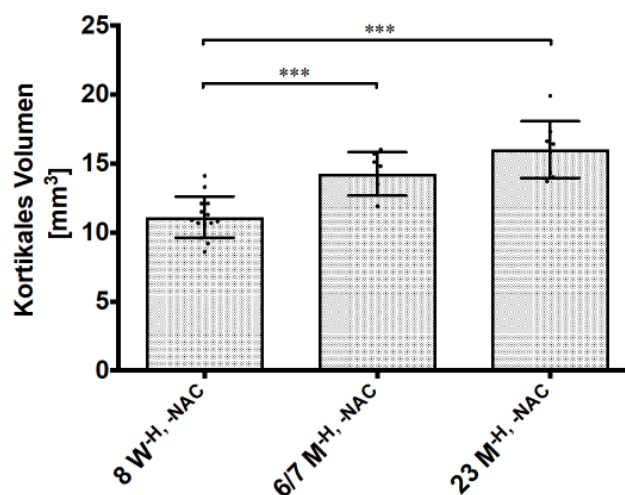
bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei -1.64 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 4.18. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten zeigt sich eine signifikante Zunahme des Trabekulären *Pattern*-Faktors mit einer Positivierung. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten und der mit 23 Monaten zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Trabekulären *Pattern*-Faktors mit einer Positivierung. Diese positiven Werte sind ein Ausdruck für eine vermehrte konvexe Form der Trabekel im Verlauf der Alterung, insbesondere im seneszenten Knochen. Der juvenile Knochen hingegen weist tendenziell negative Werte mit dadurch bedingter konkaver Form der Trabekel auf, was ein stabileres Trabekelnetzwerk widerspiegelt.



**Abbildung 28: Darstellung des Pattern-Faktors.** Trabekulärer Pattern-Faktor der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit zunehmender Positivierung im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: -0.61 (8 W), -1.64 (6/7 M), 4.18 (23 M).

### 3.1.9 Kortikales Volumen

Das kortikale Volumen (*CorticalVolume*, CV) im Verlauf der Alterung in den verschiedenen Altersgruppen ist in Abbildung 29 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 11.11, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten bei 14.24 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten bei 16. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 6/7 Monaten zeigt sich eine signifikante Zunahme des kortikalen Volumens. Ferner stellt sich eine Zunahme zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen und der mit 23 Monaten hinsichtlich des kortikalen Volumens dar. Folglich nimmt im Verlauf der Alterung vom juvenilen zum seneszenten Knochen das Volumen der Kortikalis zu. Somit verfügt der juvenile Rattenknochen über eine volumen-dünnere Kortikalis als ein adoleszenter und seneszenter Knochen.



**Abbildung 29: Darstellung der Kortikalvolumina.** Kortikales Volumen der verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit Zunahme des kortikalen Volumens im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 23 Monaten liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M);  $n = 9$  (23 M). Mittelwerte: 11.11 (8 W), 14.24 (6/7 M), 16 (23 M).

## **3.2 Veränderung der knöchernen Integrität durch Hitzestress-Behandlung im Verlauf der Alterung**

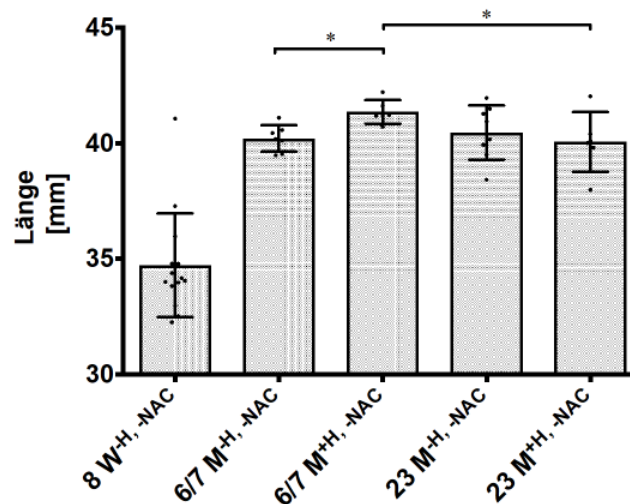
### **3.2.1 Einfluss von Hitze auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT**

Um den Einfluss von Hitze in Bezug auf die knöcherne Integrität an standardisierter Position des Knochens zu analysieren, wurden, nach der Präparation der Knochen, mikrocomputertomographische Verfahren, wie oben beschrieben, genutzt und verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Knochenalterung mit und ohne Hitzestress-Behandlung (+H/-H) vergleichend, jedoch ohne NAC-Zugabe (-NAC) graphisch dargestellt, wobei 8 W (Wochen) für das juvenile Alter, 6/7 M (Monate) für das adoleszente Alter und 23 M (Monate) für das senescente Alter der Ratten stehen.

### **3.2.2 Länge der Femura**

In Abbildung 30 ist die Länge der Femura im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 34.21, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 40.78, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 41.76, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 40.98 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 39.89. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung liegt eine signifikante Zunahme der Länge der Femura vor. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung liegt eine signifikante Abnahme der Länge vor. Insgesamt kommt es im Verlauf der Alterung mit einem Zenit in der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung zu einer Zunahme der Länge der Femura, darauf folgend kommt es zu einer tendenziellen und signifikanten Abnahme des seneszenten Knochens in der Altersgruppe mit 23 Monaten.



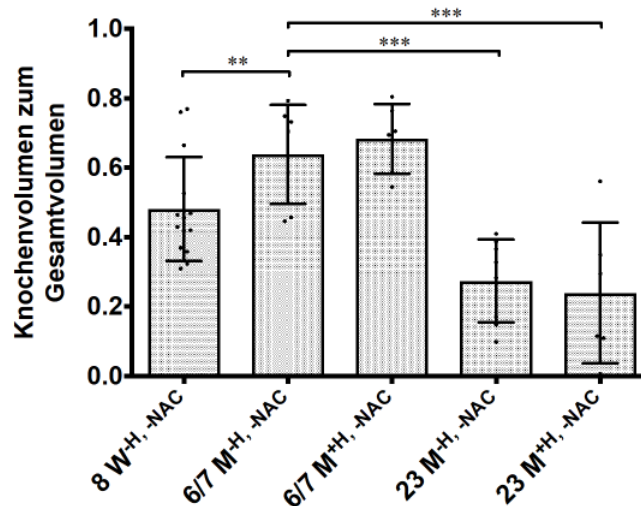


**Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Femurlängen.** Länge der Femura im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen der Tiere mit einer Zunahme der Femurlänge im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen der Altersgruppe 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-H</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>-H</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H</sup>). Mittelwerte: 34.21 (8 W), 40.78 (6/7 M<sup>-H</sup>), 41.76 (6/7 M<sup>+H</sup>), 40.98 (23 M<sup>-H</sup>), 39.89 (23 M<sup>+H</sup>).

### 3.2.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen

In Abbildung 31 wird das Knochenvolumen zum Gesamtvolumen im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.48, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.63, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.69, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.28 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.24. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des BV/TV zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung.

Eine signifikante Abnahme des BV/TV zeigt sich zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung sowie der mit 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung. Insgesamt liegt somit im juvenilen und adoleszenten Knochen ein höheres Volumen als im seneszenten Knochen vor.

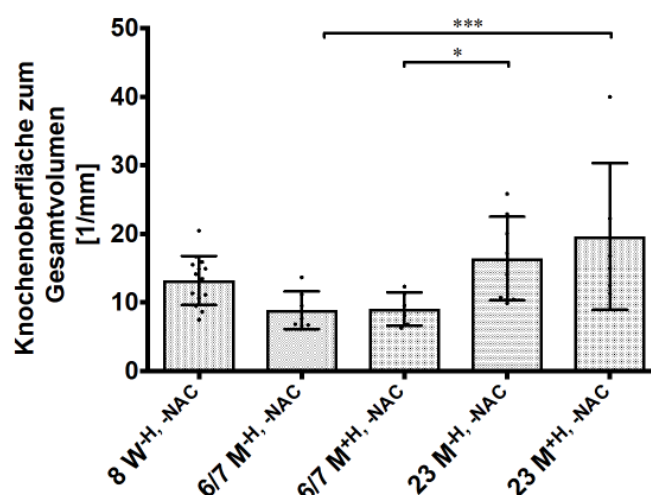


**Abbildung 31: Vergleichende Darstellung der Knochenvolumina.** Knochenvolumen zum Gesamtvolumen im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Abnahme des Knochenvolumens im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen und 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten und 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-HI</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+HI</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>-HI</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+HI</sup>). Mittelwerte: 0.48 (8 W), 0.63 (6/7 M<sup>-HI</sup>), 0.69 (6/7 M<sup>+HI</sup>), 0.28 (23 M<sup>-HI</sup>), 0.24 (23 M<sup>+HI</sup>).

### 3.2.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen

In Abbildung 32 wird die Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 12.47,

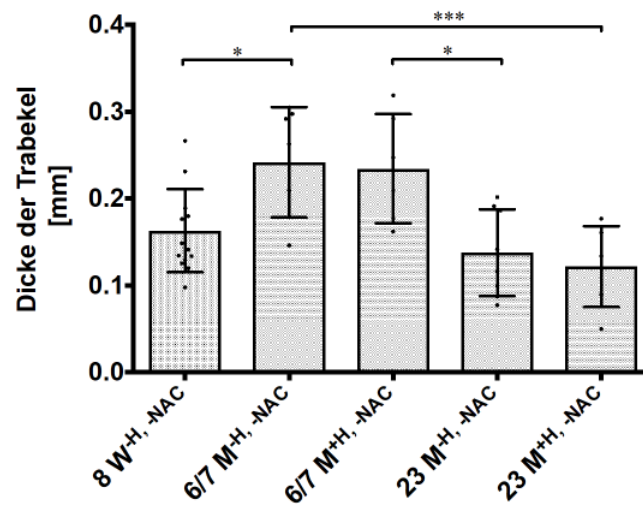
bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 9.78, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 9.75, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 18.45 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 20.63. Es zeigt sich, dass zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung eine signifikante Zunahme der Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen vorliegt. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung liegt ebenfalls eine signifikante Zunahme der Oberfläche vor. Es zeigt sich, dass es im Verlauf der Alterung zu einer tendenziellen Abnahme des BS/BV vom juvenilen zum adoleszenten Knochen kommt, welches dann zum seneszenten Knochen signifikant zunimmt.



**Abbildung 32: Vergleichende Darstellung der Knochenoberflächen.** Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Zunahme des Volumens im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten mit Hitzestress-Belastung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-H</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>-H</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H</sup>). Mittelwerte: 12.47 (8 W), 9.78 (6/7 M<sup>-H</sup>), 9.75 (6/7 M<sup>+H</sup>), 18.45 (23 M<sup>-H</sup>), 20.63 (23 M<sup>+H</sup>).

### **3.2.5 Dicke der Trabekel**

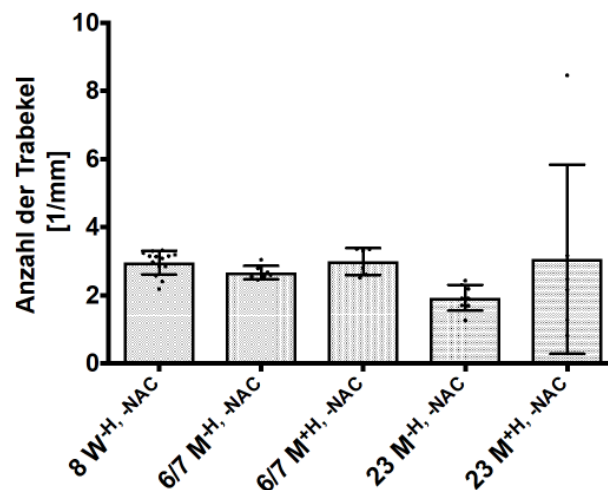
In Abbildung 33 wird die Dicke der Trabekel im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.16, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.24, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.23, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.15 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.14. Es zeigt sich, dass zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung eine signifikante Zunahme der Trabekel vorliegt. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung liegt eine signifikante Abnahme der Trabekeldicke vor. Ebenfalls zeigt sich eine signifikante Abnahme der Dicke der Trabekel zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung. Insgesamt zeigt sich eine Zunahme der Trabekeldicke vom juvenilen zum adoleszenten Knochen mit einer Abnahme der Dicke im seneszenten Knochen.



**Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der Trabekeldicken.** Dicke der Trabekel im Vergleich mit und ohne Hitze in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Abnahme der Trabekeldicke im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne Hitzestress-Behandlung und 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten mit Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen der Altersgruppe 6/7 Monaten mit Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>+H</sup>)  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>+H</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H</sup>). Mittelwerte: 0.16 (8 W), 0.24 (6/7 M<sup>+H</sup>), 0.23 (6/7 M<sup>+H</sup>), 0.15 (23 M<sup>+H</sup>), 0.14 (23 M<sup>+H</sup>).

### 3.2.6 Anzahl der Trabekel

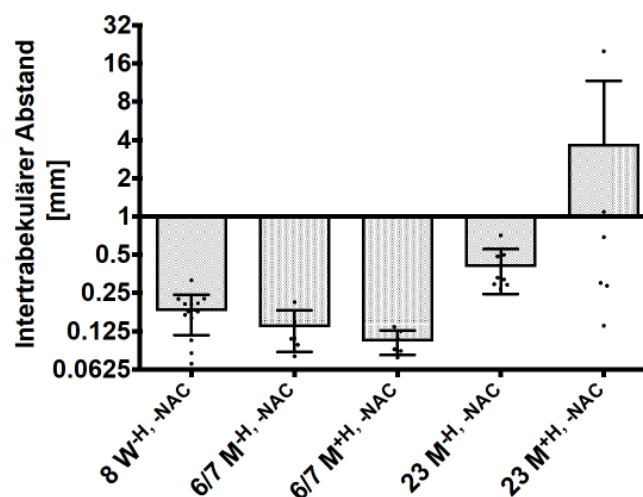
In Abbildung 34 zeigt sich die Anzahl der Trabekel im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung der verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 3.12, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 2.87, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 3.23, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 1.98 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 3.32. Es ergibt sich eine relativ konstante Trabekelanzahl vom juvenilen zum adoleszenten und seneszenten Knochen.



**Abbildung 34: Vergleichende Darstellung der Trabekelanzahl.** Anzahl der Trabekel im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung der verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer tendenziellen Abnahme der Trabekelanzahl im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>H</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>H</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+</sup>). Mittelwerte: 3.12 (8 W), 2.87 (6/7 M<sup>H</sup>), 3.23 (6/7 M<sup>+</sup>), 1.98 (23 M<sup>H</sup>), 3.32 (23 M<sup>+</sup>).

### 3.2.7 Intertrabekulärer Abstand

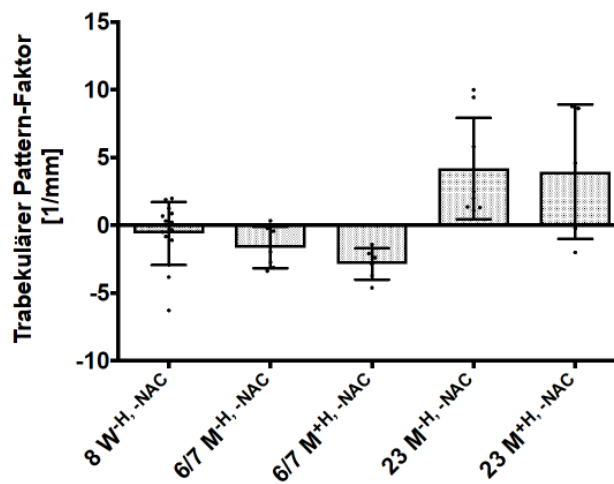
In Abbildung 35 ist der intertrabekuläre Abstand mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.18, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.13, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.12, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 0.26 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 0.38. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme des Abstandes zwischen den Trabekeln im Verlauf der Alterung mit einem Zenit im seneszenten Knochen. Dies entspricht einerseits den oben genannten Ergebnissen aus den Abbildungen 25 - 27 der reinen Knochenalterung sowie andererseits den zuvor genannten Ergebnissen aus den Abbildungen 36 - 41 mit hinzukommender Hitzestress-Behandlung. Durch ein qualitativ und quantitativ aufgelockertes trabekuläres Netzwerk kommt es zu vergrößerten Abständen zwischen den Trabekeln.



**Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der Trabekelabstände.** Intertrabekulärer Abstand im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen mit einer tendenziellen Zunahme des Abstandes im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>HI</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+HI</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>HI</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+HI</sup>). Mittelwerte: 0.18 (8 W), 0.13 (6/7 M<sup>HI</sup>), 0.12 (6/7 M<sup>+HI</sup>), 0.26 (23 M<sup>HI</sup>), 0.38 (23 M<sup>+HI</sup>).

### 3.2.8 Trabekulärer Pattern-Faktor

In Abbildung 36 ist der trabekuläre *Pattern*-Faktor mit und ohne Hitzestress-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.12, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei -2.31, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei -0.25, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 4.83 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 4.76. Es zeigt sich eine tendenzielle Positivierung im seneszenten Knochen mit einer dadurch bedingten konvexen Formgebung der Trabekel, was eine weniger stabile Trabekelwerk widerspiegelt.

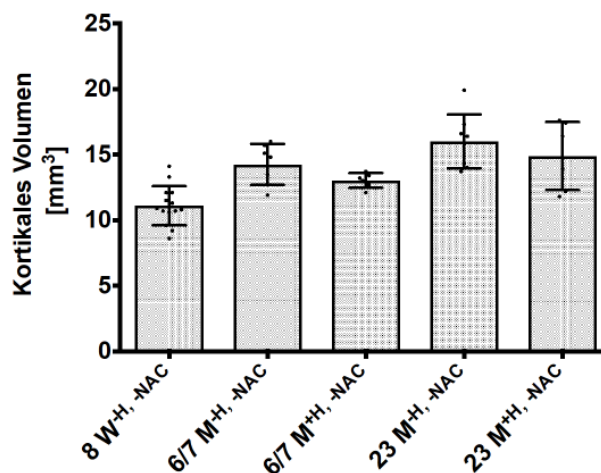


**Abbildung 36: Vergleichende Darstellung des Pattern-Faktors.** Trabekulärer Pattern-Faktor im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer konvexen Form im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>+</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>+</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+</sup>). Mittelwerte: 0.12 (8 W), -2.31 (6/7 M<sup>+</sup>), -0.25 (6/7 M<sup>+</sup>), 4.83 (23 M<sup>+</sup>), 4.76 (23 M<sup>+</sup>).



### 3.2.9 Kortikales Volumen

In Abbildung 37 zeigt sich das kortikale Volumen mit und ohne Hitzestress-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme des Volumens beginnend im juvenilen Knochen zum seneszenten Knochen. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 10.14, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 14.87, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 12.74, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung bei 16.21 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung bei 15.13.



**Abbildung 37: Vergleichende Darstellung der Kortikalvolumina.** Kortikales Volumen im Vergleich mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Zunahme des kortikalen Volumens im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>H</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>H</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>H</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>H</sup>). Mittelwerte: 10.14 (8 W), 14.87 (6/7 M<sup>H</sup>), 12.74 (6/7 M<sup>H</sup>), 16.21 (23 M<sup>H</sup>), 15.13 (23 M<sup>H</sup>).

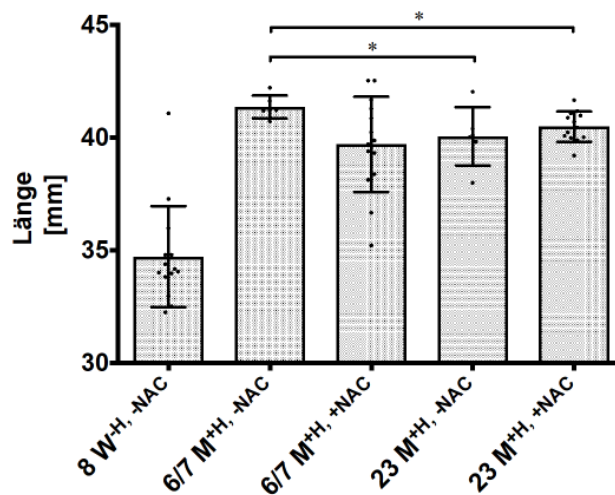
### **3.3 Einfluss von NAC auf die Knochenstruktur im Verlauf der Alterung**

#### **3.3.1 Effekt von NAC auf die Knochenstruktur gemessen im $\mu$ CT**

Um die Veränderungen und den Effekt von NAC als Antioxidans in Bezug auf die knöcherne Integrität an standardisierter Position des Knochens zu analysieren, wurden, nachdem die Knochen präpariert waren, mikrocomputertomographische Verfahren wie oben beschrieben, genutzt und verwendet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Knochenalterung mit NAC-Behandlung (+NAC) und Hitzestress-Behandlung (+H) vergleichend (+NAC, -NAC) graphisch dargestellt, wobei 8 W (Wochen) für das juvenile Alter, 6/7 M (Monate) für das adoleszente Alter und 23 M (Monate) für das seneszente Alter der Ratten steht. Es wurden 25 Ratten 30 min. vor ihrer Opferung das Antioxidans NAC intraperitoneal appliziert und im Vorfeld von 5 Tagen dem Trinkwasser zugegeben. Die Ergebnisse des Einflusses von NAC auf den Knochen werden in den folgenden Graphiken dargestellt.

#### **3.3.2 Länge der Femura**

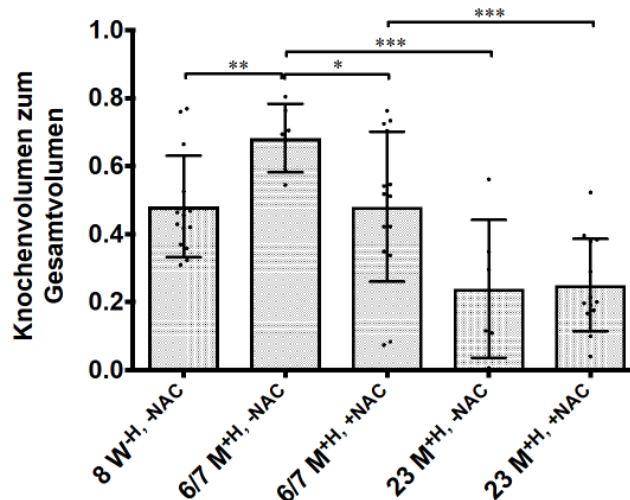
In Abbildung 38 ist die Länge der Femura mit und ohne NAC-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 34.87, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 41.34, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 39.57, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 40.01 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 41.12. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Femurlänge zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung. Ebenso zeigt sich dies zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung. Insgesamt zeigt sich, dass die Länge der Femura im Verlauf der Alterung zunimmt und es zu einer signifikanten Abnahme im seneszenten Knochen im Vergleich zum adoleszenten Knochen in der Länge kommt.



**Abbildung 38: Vergleichende Darstellung der Femurlängen.** Länge der Femura mit und ohne NAC-Behandlung im Vergleich der verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Zunahme der Länge im adoleszenten und seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 34.87 (8 W), 41.34 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 39.57 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 40.01 (23 M<sup>-NAC</sup>), 41.12 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### **3.3.3 Knochenvolumen zum Gesamtvolumen**

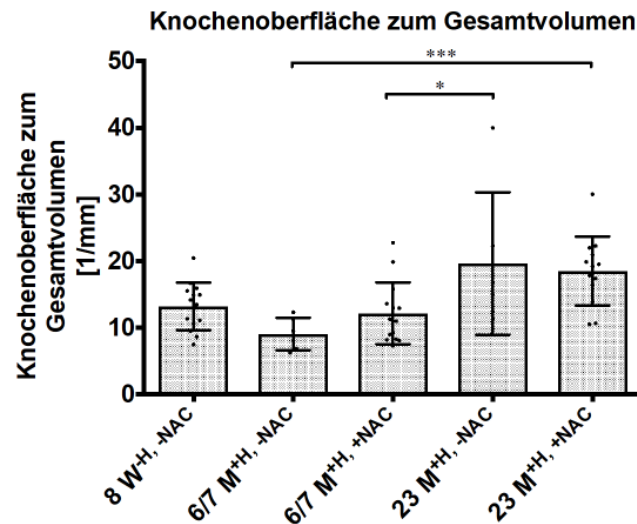
In Abbildung 39 ist das Knochenvolumen zum Gesamtvolumen mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.46, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.69, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.48, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.27 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.31. Es zeigt sich zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung eine signifikante Zunahme des Volumens. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine signifikante Abnahme vor. Ebenso zeigt sich eine signifikante Abnahme des Knochenvolumens zum Gesamtvolumen zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung. Außerdem liegt eine Abnahme des BV/TV zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung vor. Insgesamt zeigt sich eine signifikante Abnahme des Volumens unter NAC-Behandlung im Vergleich zu einer Behandlung ohne NAC im adoleszenten Knochen. Dies spiegelt einen negativen, tendenziell pro-oxidativen Effekt von NAC im adoleszenten Knochen wider. Demgegenüber zeigt sich im seneszenten Knochen ein tendenziell stabiles Knochenvolumen zum Gesamtvolumen unter NAC-Behandlung im Vergleich zu dem ohne NAC-Behandlung. Dies spiegelt einen positiven, tendenziell anti-oxidativen Effekt von NAC im seneszenten Knochen wider.



**Abbildung 39: Vergleichende Darstellung der Knochenvolumina.** Knochenvolumen zum Gesamtvolumen mit und ohne NAC-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einem negativen (pro-oxidativen) Effekt von NAC im adoleszenten Knochen und einem positiven (anti-oxidativen) Effekt von NAC im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 0.46 (8 W), 0.69 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 0.48 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 0.27 (23 M<sup>-NAC</sup>), 0.31 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### **3.3.4 Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen**

In Abbildung 40 ist die Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 11.84, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 9.97, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 10.89, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 20.13 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 20.03. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Knochenoberfläche zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung. Ebenso zeigt sich eine signifikante Zunahme der Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen im Vergleich zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung. Insgesamt nimmt somit das BS/BV im Verlauf der Alterung zum seneszenten Knochen signifikant zu.

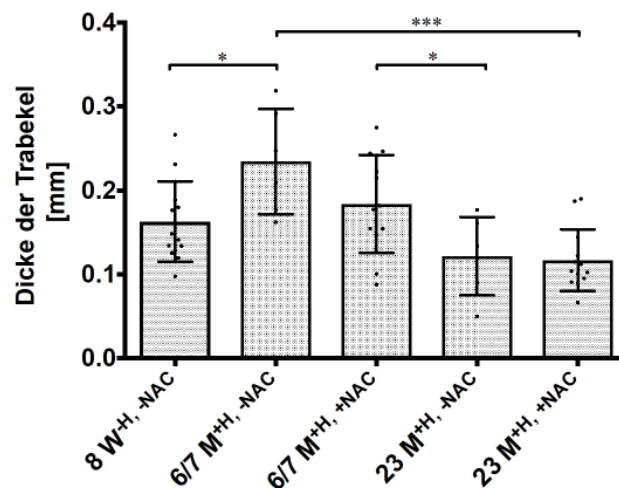


**Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der Knochenoberflächen.** Knochenoberfläche zum Gesamtvolumen mit und ohne NAC-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Zunahme der Knochenoberfläche im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 11.84 (8 W), 9.97 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 10.89 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 20.13 (23 M<sup>-NAC</sup>), 20.03 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### **3.3.5 Dicke der Trabekel**

In Abbildung 41 ist die Dicke der Trabekel mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.16, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.24, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.19, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.13 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.12. Im Vergleich zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine signifikante Zunahme der Trabekeldicke vor. Zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung zeigt sich eine signifikante Abnahme der Dicke. Ebenso stellt sich eine signifikante Abnahme der Trabekeldicke zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung dar. Insgesamt zeigt sich eine Tendenz in der Abnahme der Dicke unter NAC-Behandlung im Vergleich zu den ohne NAC-Behandlung im adoleszenten Knochen. Dies spiegelt, wie zuvor in Abbildung 39 dargestellt, einen negativen, tendenziell pro-oxidativen Effekt von NAC im adoleszenten Knochen wider. Demgegenüber zeigt sich im seneszenten Knochen eine tendenziell stabile Dicke der Trabekel unter NAC-Behandlung zur Behandlung ohne NAC. Dies spiegelt wiederum, wie zuvor in Abbildung 39 dargestellt, einen positiven, tendenziell anti-oxidativen Effekt von NAC im seneszenten Knochen wider.

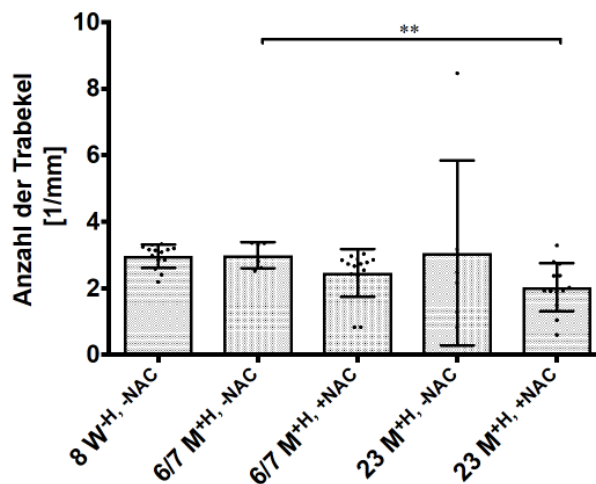




**Abbildung 41: Vergleichende Darstellung der Trabekeldicken.** Dicke der Trabekel mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einem negativen (pro-oxidativen) Effekt von NAC im adoleszenten Knochen und einem positiven (anti-oxidativen) Effekt von NAC im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 0.16 (8 W), 0.24 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 0.19 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 0.13 (23 M<sup>-NAC</sup>), 0.12 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### 3.3.6 Anzahl der Trabekel

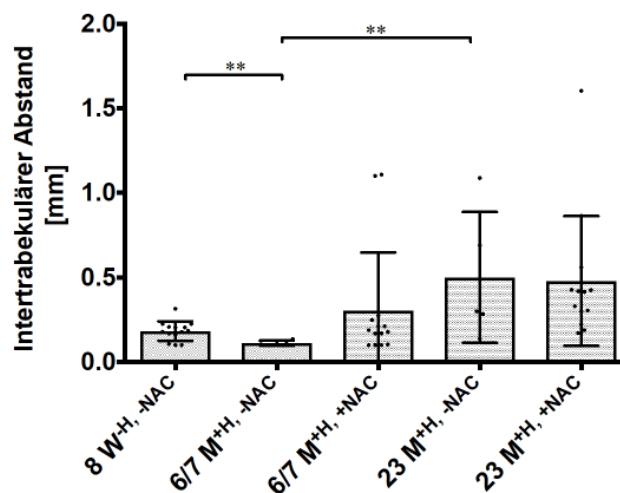
In Abbildung 42 ist die Anzahl der Trabekel mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 2.98, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 3.12, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 2.76, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 3.21 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 2.24. Im Vergleich zwischen der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine signifikante Abnahme der Trabekelanzahl vor. Insgesamt nimmt im Verlauf der Alterung vom juvenilen zum seneszenten Knochen die Anzahl der Trabekel ab.



**Abbildung 42: Vergleichende Darstellung der Trabekelanzahl.** Anzahl der Trabekel mit und ohne NAC-Behandlung im Vergleich in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Abnahme der Anzahl im adoleszenten und seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten mit NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 2.98 (8 W), 3.12 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 2.76 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 3.21 (23 M<sup>-NAC</sup>), 2.24 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### **3.3.7 Intertrabekulärer Abstand**

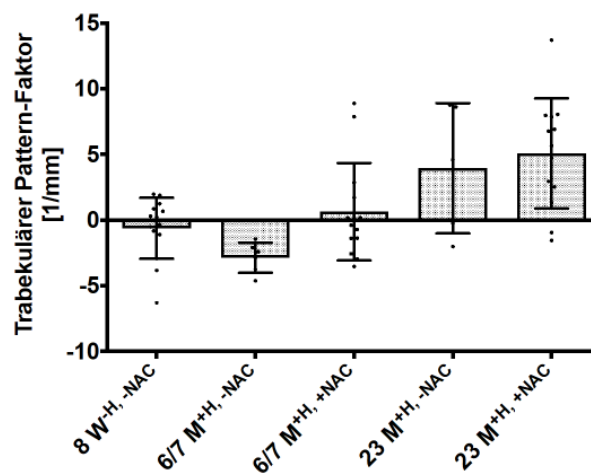
In Abbildung 43 ist der intertrabekuläre Abstand mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0.19, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.09, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.38, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 0.51 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.49. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung zeigt sich eine signifikante Abnahme des Abstandes zwischen den Trabekeln. Der Abstand zwischen den Trabekeln nimmt im Vergleich zu der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung signifikant zu. Insgesamt nimmt im Verlauf der Alterung der intertrabekuläre Abstand der Knochen zu. Diese Ergebnisse des intertrabekulären Abstandes mit NAC-Behandlung (vgl. Abb.43) passen einerseits zu den oben genannten Ergebnissen aus den Abbildungen 25 - 27 der reinen Knochenalterung sowie andererseits zu den oben genannten Ergebnissen aus den Abbildungen 33 und 34 der Hitzestress-Behandlung, so dass es durch ein qualitativ und quantitativ aufgelockertes trabekuläres Netzwerk zu vergrößerten Abständen zwischen den Trabekeln kommt.



**Abbildung 43: Vergleichende Darstellung der Trabekelabstände.** Intertrabekulärer Abstand mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer Zunahme des Abstandes. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor. Zwischen Altersgruppe 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 0.19 (8 W), 0.09 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 0.38 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 0.51 (23 M<sup>-NAC</sup>), 0.49 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### 3.3.8 Trabekulärer Pattern-Faktor

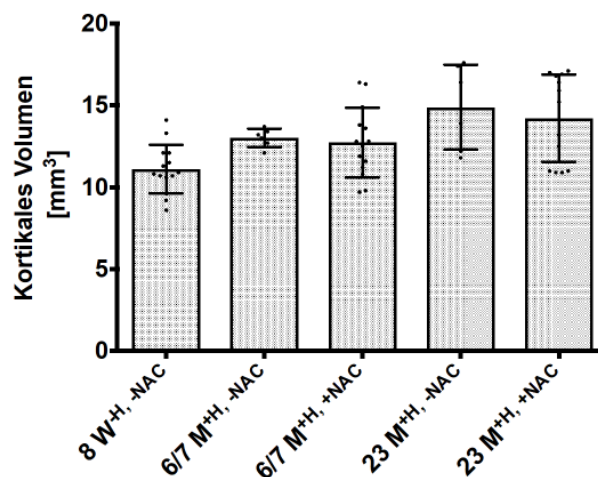
In Abbildung 44 ist der trabekuläre *Pattern*-Faktor mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei -0.02, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei -2.56, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 0.02, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 3.86 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 4.94. Es zeigt sich eine im Verlauf der Alterung vom juvenilen zum seneszenten Knochen, zunehmende tendenzielle Positivierung des trabekulären *Pattern*-Faktors mit dadurch bedingter Zunahme einer konvexen Formgebung, vor allem im seneszenten Knochen. Demgegenüber überwiegt eine tendenzielle Negativierung mit dadurch bedingter konkaver Formgebung im juvenilen und adoleszenten Knochen.



**Abbildung 44: Vergleichende Darstellung des Pattern-Faktors.** Trabekulärer *Pattern*-Faktor mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung mit einer tendenziellen Positivierung im seneszenten Knochen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: -0.02 (8 W), -2.56 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 0.02 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 3.86 (23 M<sup>-NAC</sup>), 4.94 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### 3.3.9 Kortikales Volumen

In Abbildung 45 ist das kortikale Volumen mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 10.89, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 13.42, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit NAC-Behandlung bei 13.12, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung bei 14.73 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung bei 13.79. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme des Volumens vom juvenilen zum seneszenten Knochen.



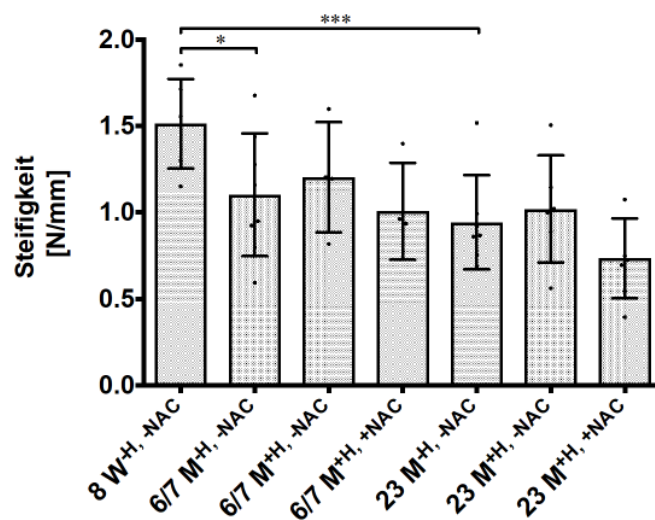
**Abbildung 45: Vergleichende Darstellung der Kortikalvolumina.** Kortikales Volumen mit und ohne NAC-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen mit einer tendenziellen Zunahme des Volumens im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $n = 12$  (8 W);  $n = 10$  (6/7 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+NAC</sup>). Mittelwerte: 10.89 (8 W), 13.42 (6/7 M<sup>-NAC</sup>), 13.12 (6/7 M<sup>+NAC</sup>), 14.73 (23 M<sup>-NAC</sup>), 13.79 (23 M<sup>+NAC</sup>).

### **3.4 Ergebnisse der biomechanischen Stabilitätsmessung**

Zur Untersuchung der biomechanischen Charakteristika der Femura wurden diese einem 4-Punktbiegetest unterzogen. Es wurden die kontralateralen Femora (die ipsilateralen Femora wurden zuvor für die Mikrocomputertomographie-Analyse verwendet) im selben Tier genutzt. Die Parameter der biomechanischen Stabilitätsmessung, welche untersucht wurden, waren die Steifigkeit (*Stiffness*, N/mm), also die Kraft (N) an möglicher Deformation des Knochens bis zum Bruch, die maximale Kraft (*Ultimate Strength*, N) des Knochens und das Biegemoment (*Maximum Bending Moment*, Nm), also die Elastizität des Knochens sowie das *Displacement at max. load* (DAML).

#### **3.4.1 Steifigkeit**

Die Steifigkeit (*Stiffness*) der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung ist in Abbildung 46 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 1.51, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.23, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.37, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 1.12, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 0.97, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.08 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 0.79. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung zeigt sich eine signifikante Abnahme der Steifigkeit. Ebenso zeigt sich zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung eine signifikante Abnahme. Insgesamt verliert der Knochen im Verlauf der Alterung an Steifigkeit.

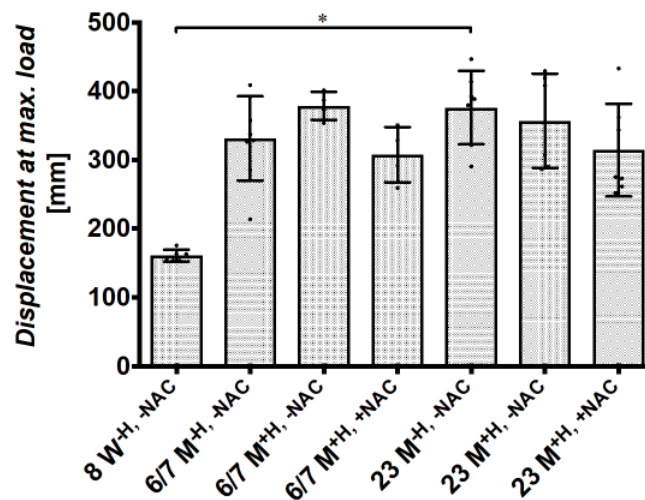


**Abbildung 46: Darstellung der Steifigkeiten.** Abnehmende Steifigkeit mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $***p < 0.001$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>);  $n = 9$  (23M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+H/+NAC</sup>). Mittelwerte: 1.51 (8 W), 1.23 (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>), 1.37 (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>), 1.12 (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>), 0.97 (23M<sup>-H/-NAC</sup>), 1.08 (23 M<sup>+H/-NAC</sup>), 0.79 (23 M<sup>+H/+NAC</sup>).



### **3.4.2 Displacement at max. load**

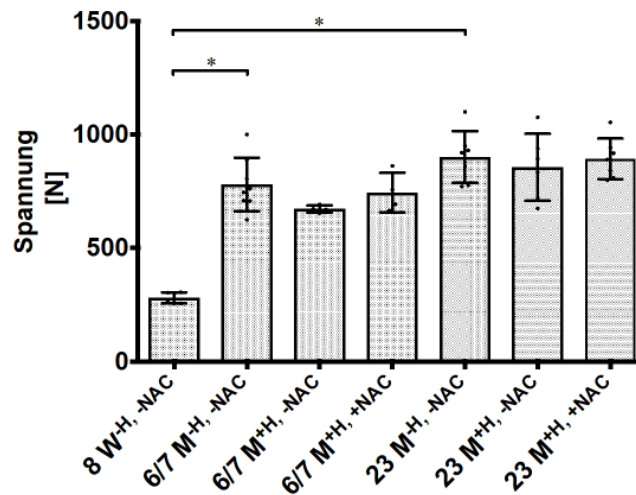
Das *Displacement at max. load* (DAML) der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung ist in Abbildung 47 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 156,61, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 312,32, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 367,83, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 304,62, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 362,45, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 324,67 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 307,42. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung zeigt sich eine signifikante Zunahme des DAML.



**Abbildung 47: Darstellung des Displacement at max. load (DAML).** DAML der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen mit einer Zunahme im Verlauf der Alterung. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>);  $n = 9$  (23 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+H/+NAC</sup>). Mittelwerte: 156.61(8 W), 312.32 (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>), 367.83 (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>), 304.62 (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>), 362.45 (23M<sup>+H/-NAC</sup>), 324.67 (23 M<sup>+H/-NAC</sup>), 307.42 (23 M<sup>+H/+NAC</sup>).

### **3.4.3 Spannung**

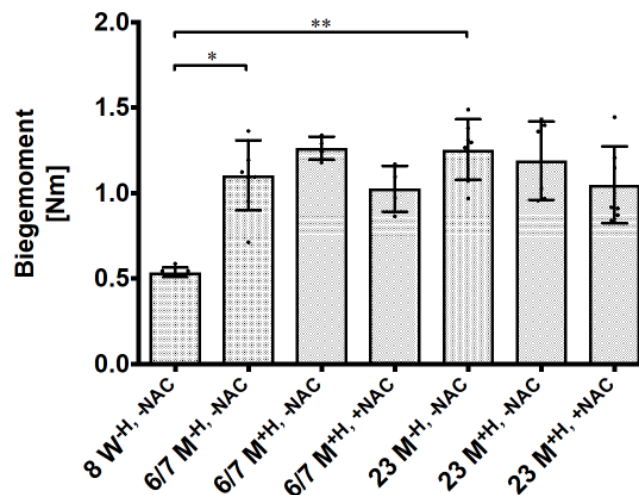
In Abbildung 48 ist die Spannung (*Ultimate Strength*), also die maximale Kraft, der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 253.78, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 768.45, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 721.42, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 745,67, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 834.21, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 812.78 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 828.79. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung zeigt sich eine signifikante Zunahme der Spannung. Ebenfalls stellt sich zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung eine Zunahme der Spannung dar. Insgesamt nimmt die Kraft an möglicher Deformation des Knochens bis zum Bruch im Verlauf der Alterung zu.



**Abbildung 48: Darstellung der Spannungen.** Zunehmende Spannung mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>);  $n = 9$  (23M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+H/+NAC</sup>). Mittelwerte: 253.78 (8 W), 768.45 (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>), 721.42 (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>), 745.67 (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>), 834.21 (23M<sup>-H/-NAC</sup>), 812.78 (23 M<sup>+H/-NAC</sup>), 828.79 (23 M<sup>+H/+NAC</sup>).

#### **3.4.4 Biegemoment**

Das Biegemoment (*Maximum Bending Moment*) der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf der Alterung ist in Abbildung 49 dargestellt. Der Mittelwert befindet sich bei der Altersgruppe mit 8 Wochen bei 0,51, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.12, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.21, bei der Altersgruppe mit 6/7 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 1.04, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten ohne Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.24, bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/ohne NAC-Behandlung bei 1.91 und bei der Altersgruppe mit 23 Monaten mit Hitzestressbehandlung/mit NAC-Behandlung bei 1.02. Im Vergleich zu der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung zeigt sich eine signifikante Zunahme des Biegemoments. Ebenfalls stellt sich zwischen der Altersgruppe mit 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und der mit 23 Monaten mit NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung eine Zunahme des Biegemoments dar. Insgesamt nimmt das Biegemoment, also die Elastizität im Verlauf der Alterung zu.



**Abbildung 49: Darstellung der Biegemomente.** Biegemoment der Knochen mit und ohne NAC-Behandlung sowie mit und ohne Hitzestress-Behandlung vergleichend in den verschiedenen Altersgruppen. Die Daten sind als durchschnittliche  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 6/7 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $*p < 0.05$  vor. Zwischen Altersgruppe 8 Wochen ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung und 23 Monaten ohne NAC-Behandlung/ohne Hitzestress-Behandlung liegt eine Signifikanz von  $**p < 0.01$  vor.  $n = 12$  (8 W);  $n = 7$  (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 10$  (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 12$  (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>);  $n = 9$  (23M<sup>-H/-NAC</sup>);  $n = 8$  (23 M<sup>+H/-NAC</sup>);  $n = 13$  (23 M<sup>+H/+NAC</sup>). Mittelwerte: 0.51 (8 W), 1.12 (6/7 M<sup>-H/-NAC</sup>), 1.21 (6/7 M<sup>+H/-NAC</sup>), 1.04 (6/7 M<sup>+H/+NAC</sup>), 1.24 (23M<sup>-H/-NAC</sup>), 1.02 (23 M<sup>+H/-NAC</sup>), 1.02 (23 M<sup>+H/+NAC</sup>).

### **3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **3.5.1 Effekt der Alterung im $\mu$ CT**

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass im Verlauf der Alterung die Länge des Knochens zunimmt, es zu einer Abnahme an Knochenvolumen kommt, die Anzahl und die Dicke der Trabekel abnehmen und dadurch der intertrabekuläre Bereich an Abstand gewinnt. Somit liegt eine ausgeprägte Trabekelstruktur im adoleszenten Knochen und ein Verlust an knöcherner Integrität im Verlauf der Alterung vor. Es zeigt sich also insgesamt, dass die juvenilen Knochen der Wistar Ratten signifikant kleiner sind und dass sie eine dicke und eng vernetzte trabekuläre Struktur im Vergleich zu den beiden adoleszenten und seneszenten Gruppen haben. Die adoleszenten Knochen sind signifikant am längsten und zeigen die höchste Knochendichte, wohingegen seneszente Knochen sowohl an Länge als auch an Knochendichte verlieren (vgl. Abb. 22 - 29).

#### **3.5.2 Effekt der Hitzestress-Behandlung im $\mu$ CT**

Zwischen den Tieren mit und ohne Hitzestress-Behandlung hat sich kein signifikanter Unterschied für die jeweilige Altersgruppe im Verlauf der Alterung in der Hitzestress-Behandlung gezeigt (vgl. Abb. 30 - 37).

#### **3.5.3 Effekt der NAC-Behandlung im $\mu$ CT**

Das Antioxidans NAC scheint im mittleren, adoleszenten Alter eher einen schlechten, tendenziell pro-oxidativen Effekt zu haben. Dies spiegelt sich vor allem in Abbildung 39 und 41 wider, wo sich insgesamt eine signifikante Abnahme des Knochenvolumens zum Gesamtvolumen (vgl. Abb. 39) und in der Dicke der Trabekel (vgl. Abb. 41) unter NAC-Behandlung im Vergleich zu der ohne NAC-Behandlung im adoleszenten Knochen zeigt. Dies spiegelt einen negativen, respektive schlechten Effekt von NAC im adoleszenten Knochen wider. Demgegenüber zeigt sich im seneszenten Knochen ein tendenziell stabiles Knochenvolumen zum Gesamtvolumen sowie eine tendenziell stabile

Trabekeldicke (vgl. Abb. 41) unter NAC-Behandlung im Gegensatz zu der ohne NAC-Behandlung. Dies spiegelt einen im gealterten, seneszenten Knochen eher gleichbleibenden, stabilen, tendenziell anti-oxidativen Effekt von NAC als Antioxidans wider. Unter dem Einfluss des Antioxidans NAC nimmt die trabekuläre Struktur im adoleszenten Knochen ab, was auf einen tendenziell pro-oxidativen Effekt hinweist. Am seneszenten Knochen hingegen scheint NAC anti-oxidativ zu wirken und zwar mit einer vermehrten und dichteren trabekulären Struktur. Summa summarum scheint NAC einen dualen Einfluss in Form eines pro-oxidativen Effekts in der Adoleszenz und eines anti-oxidativen Effekts im seneszenten Knochen zu haben.

#### **3.5.4 Biomechanische Stabilitätsmessung**

Zwischen den Tieren in der jeweiligen Altersgruppe hat sich über den Verlauf der Alterung gezeigt, dass die Steifigkeit der Knochen im Verlauf der Alterung abnimmt und infolgedessen eine geringere Kraft an möglicher Deformation bis zum Bruch des Knochens erforderlich ist. Des Weiteren nimmt die maximale Kraft und das Biegemoment, also die Elastizität des Knochens im Verlauf der Alterung zu (vgl. Abb. 46 - 49).



#### **4. Diskussion**

Alterung ist ein physiologischer Prozess, welcher durch verschiedenste Faktoren beeinflusst und verursacht wird. Eine Theorie ist, dass sich freie Radikale akkumulieren, wodurch die zellulären sowie extrazellulären Strukturen beschädigt werden und dies die zelluläre Homöostase stört. Diese Störung limitiert die Lebensdauer einer einzelnen Zelle und somit eines ganzen Organismus. Bereits 1957 beschrieb Denham Harman diese „Theorie der freien Radikalen“ [37]. Diese Effekte spiegeln sich an unterschiedlichsten Organen wider, die in unserem Fall am Knochen untersucht wurden. Die Methodik der vorliegenden Studie stützt sich auf ein etabliertes Protokoll von Zhang et al., welche beschrieben hatte, dass juvenile Tiere über ein effektives oxidatives Schutzsystem der Leber verfügen, im Unterschied zu gealterten Tieren, bei welchen ein höheres oxidatives Stress-Level vorliegt, welches mit Veränderungen in der Transduktion einhergeht, was zu einer zellulären Dysfunktion führen kann [114]. Die Anwendung im Protokoll von Zhang et al. erfolgte durch Hyperthermie, wobei das Organ Leber im Fokus stand. Anknüpfend an dieses Protokoll wurden im Siegfried Weller Institut Studien durchgeführt, bei denen eine dieser Studien die altersabhängigen Zellschäden vor und nach einem Hitzestress-Versuch, bestehend aus zwei Phasen, im Serum und im Gewebe der Leber von Wistar-Ratten verschiedener Altersgruppen untersucht hat [120]. Dort konnte gezeigt werden, dass es zu keinem signifikanten Anstieg der oxidativen Marker, jedoch zu einer erhöhten Zellschädigung in der Leber der seneszenten Tiere, im Vergleich zu den juvenilen Tieren auf histologischer Ebene gekommen ist [120]. Eine weitere Studie untersuchte die Veränderungen des antioxidativen Systems unter Hitzestress-Behandlung am Glutathion-Stoffwechsel mit Zusatz von NAC als Antioxidans im Verlauf der Alterung von Wistar-Ratten am Organ der Leber [45]. Dort konnte dargestellt werden, dass die Behandlung mit NAC als Antioxidans einen dualen Effekt mit einer tendenziell pro-oxidativen Wirkung im adoleszenten Tier und einer tendenziell anti-oxidativen Wirkung im seneszenten Tier einnimmt [45]. Wir untersuchten in unserer Studie eine ähnliche Fragestellung und zwar den Einfluss von oxidativem Stress durch Hitzestress-Behandlung mit Zusatz von

NAC als Antioxidans, jedoch am Zielorgan Knochen im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien, welche das Organ Leber in den Fokus setzten, um eine Leber-Knochen-Achse zu untersuchen. Ferner wurden dieselben Tiere in dieser Studie verwendet, welche zuvor in den Leber-Studien Anwendung fanden.

#### **4.1 Effekt der Alterung auf den Knochen**

Wir konnten in unserer Studie am Knochen zeigen, dass im Verlauf der Alterung die juvenilen Knochen der Wistar Ratten signifikant kleiner sind und dass sie eine dicke und eng vernetzte trabekuläre Struktur im Vergleich zu den beiden älteren Gruppen zeigten [141]. Die adoleszenten Knochen sind signifikant am längsten und zeigen die höchste Knochendichte, wohingegen der senescente Knochen sowohl an Länge als auch an Knochendichte verliert [141]. Dies zeigt, dass sich im Verlauf der Alterung der Knochen verändert. Dies spiegelt sich bereits in Studien wider, die ebenfalls zeigen konnten, dass sich im Verlauf der Alterung die knöcherne Integrität durch eine Abnahme der Knochenmasse in der Seneszenz verändert [1, 6]. Almeida und O'Brien führen dies auf eine Abnahme funktionsfähiger Osteoblasten, mesenchymaler Stammzellen, Zunahme in der Apoptose und auf eine gesteigerte Adipogenese zurück [1]. Song et al. führten dies in Übereinstimmung mit Almeida et al. auf, als dass es durch eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in den Osteoprogenitorzellen bei erwachsenen Mäusen zu einer erhöhten Expression von PPAR $\gamma$ 2 und damit einhergehend zu einer vermehrten Knochenmarksadipositas sowie einer verminderten Knochenmasse kommt [58].

#### **4.2 Effekt von NAC auf den Knochen in Bezug zum Organ Leber**

Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse, dass oxidativer Stress einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf der Alterung hat. Um diesen schädigenden Effekt von ROS zu reduzieren, wurde NAC als Antioxidans zur Stärkung der antioxidativen Kapazität der Zellen eingesetzt. Unter dem Einfluss des Antioxidans NAC konnten wir zeigen, dass die trabekuläre Struktur im adoleszenten Knochen

abnimmt, was auf einen tendenziell pro-oxidativen Effekt hinweist. Am seneszenten Knochen hingegen scheint NAC anti-oxidativ mit vermehrter und dichterem trabekulärer Struktur zu wirken. Dies spricht dafür, dass NAC eine duale Rolle einnimmt, sogar unter bestimmten Umständen einen anti-oxidativen Effekt zeigt, aber auch einen pro-oxidativen Effekt einnehmen kann. Dieser duale Effekt des Antioxidans NAC konnte ebenfalls in der zuvor oben genannten Studie im Organ Leber festgestellt werden [45]. Dort konnte ebenfalls dargestellt werden, dass die Behandlung mit NAC als Antioxidans einen dualen Effekt mit einer tendenziell pro-oxidativen Wirkung im adoleszenten Tier und einer tendenziell anti-oxidativen Wirkung im seneszenten Tier in der Leber einnimmt [45]. Eine unserer Hypothesen war, dass durch den Zusatz von Antioxidantien der oxidative Stress durch Hitzestress-Behandlung reduziert und somit der Alterungsprozess verzögert werden kann. Zum einen wäre es möglich, dass die im NAC enthaltene Thiol-Gruppe zu einer Auto-Oxidation mit Auslösung von hoch-reaktiven Radikalen mit Schädigung von Molekülen führt, wodurch die interzelluläre Kommunikation gestört wird, Apoptose ausgelöst wird und es zu einer Schädigung der DNS kommen kann [95, 121, 122]. Zum anderen wäre es möglich, dass NAC abhängig von der intrazellulären ROS-Konzentration seine Wirkung entfaltet. Finn et al. beschrieben ebenfalls den dualen Effekt des NAC in akuten lymphatischen Leukämiezellreihen in Abhängigkeit von der intrazellulären ROS-Konzentration. Bei niedrigen ROS-Spiegeln zeigte NAC einen pro-oxidativen Effekt, wobei es bei einem höheren Level an ROS eher anti-oxidativ wirkte [123]. Dies würde sich in Einklang mit den von uns untersuchten Knochen bringen lassen: man müsste davon ausgehen, dass die adoleszenten Knochen über einen niedrigen ROS-Spiegel verfügen, somit tendenziell eher einen durch NAC bedingten pro-oxidativen Effekt entfalten würden. Im Gegensatz dazu besteht die Möglichkeit, dass der seneszente Knochen über ein höheres Level an freien ROS verfügt und somit tendenziell eher einen durch NAC bedingten anti-oxidativen Effekt entfalten könnte. Die erhöhten ROS-Spiegel in der Seneszenz am Knochen kommen zusammenfassend unter anderem durch eine veränderte Epigenetik, gestörte mitochondriale Kaskaden und Redox-Verhältnisse, metabolischen Veränderungen, verminderte Reparatur-

mechanismen, einer gestörten Genexpression sowie Protein-Prozessierung zustande und führen somit letztlich zu einem erniedrigten oder gar gehemmten antioxidativen System mit erhöhten schädigenden ROS-Leveln [124-127].

#### **4.3 Art und Verabreichung des Antioxidans NAC**

Ferner wurde NAC den Tieren im Trinkwasser (0,5% NAC) und durch intraperitoneale Gabe (50mg/kg KG) appliziert. Fraglich ist, inwiefern diese Applikationsformen einen ausreichend anti-oxidativen Wirkspiegel im Knochen erreichen und, ob die gewählten Konzentrationen in Abhängigkeit von ihrer gewählten zeitlichen Darreichung genügen. Denn bezogen auf die Wirkdauer ist ein möglicherweise verlangsamter Stoffwechselumsatz am Knochen festzuhalten, welcher ebenfalls die Wirkung von NAC beeinflussen könnte. Dennoch sehen wir bereits bei kurzer Gabe von NAC eine Tendenz mit der Hypothese, dass durch eine längere Gabe, anders gewählter Konzentrationen oder auch Applikationsformen ein deutlicherer Effekt am Knochen zu zeigen wäre. So konnten Liang et al. den Einfluss und die Auswirkungen auf die Aktivität des Knochenstoffwechsels bei gealterten Ratten auf zellulärer und molekularer Ebene untersuchen und darstellen, dass sich signifikante Veränderungen der knöchernen Homöostase erst ab dem 6. Tag ausprägten [128]. Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass auch nach kurzer NAC-Applikation ein Effekt am Knochen festzustellen ist.

#### **4.4 Behandlung durch Hyperthermie**

Die Tiere wurden in den Leber-Studien mehreren Hyperthermie-Intervallen mit verschiedenen Zeitintervallen bis hin zur Tötung unterzogen [45, 120]. Dies stellt sich in den Gegensatz zu den Tieren in unserer Studie, welche direkt im Anschluss an die Hitzestress-Behandlung getötet wurden. Es ist möglich, wie zuvor bei der Art und Verabreichung von NAC angesprochen, dass in dieser kurzen Zeit die Auswirkungen der Hitze den Knochen nicht erreicht haben könnten. Die direkte Tötung nach Hitzestress-Behandlung kann dazu geführt haben, dass diese ihren am Knochen möglicherweise langsameren Effekt und

ihre volle Wirkung in Form eines oxidativen Stressfaktors nicht gänzlich entfalten konnte, so dass die Qualität und Quantität der Hitzestress-Behandlung in Form von Dauer und Häufigkeit intensiver gewählt, möglicherweise signifikantere Aussagen zugelassen hätte. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen wider, die keinen signifikanten Unterschied zu den Tieren mit und ohne Hitzestress-Behandlung zeigten. Liang et al. untersuchten und stellten dar, dass der Einfluss und die Auswirkungen auf die Aktivität des Knochenstoffwechsels bei gealterten Ratten auf zellulärer und molekularer Ebene mit signifikanten Veränderungen der knöchernen Homöostase erst ab dem 6. Tag ausprägt waren. Nussler et al. konnten beispielsweise in einem Mausmodell darstellen, dass am Knochen nach 6 Wochen im  $\mu$ CT nach Tetrachlormethan-( $\text{CCl}_4$ )-Behandlung sich sichtbare Veränderungen zeigten [129]. In einer anderen Studie von Lin et al. konnte im Rattenmodell untersucht werden, dass nach 12 Wochen nach Gabe eines HMG-CoA-Reduktasehemmers, in diesem Fall Atorvastatin, im  $\mu$ CT sowie in der Biomechanik ein positiver Effekt dieses Medikaments am Knochen nachgewiesen werden konnte [130]. Dies zeigt, dass sich der Effekt einer Hitzestress-Behandlung oder anderer Faktoren wie oben beschrieben möglicherweise nicht sofort am Knochen darstellt. Das ist bedingt durch einen langsameren Knochenumsatz, wodurch anders gewählte Zeiten der Applikation von Hitzestress-Behandlung und anders gewählte Zeiten der Liquidation der Tiere nach Hitzestress-Behandlung in einem veränderten Zeitraum von zum Beispiel einigen Tagen bis mehreren Wochen potenziell weitere Ergebnisse hätte zeigen können.

#### **4.5 Darstellung der Tiere**

Des Weiteren verwendeten Zhang et al. in ihrem Studien-Modell männliche Fischer-344-Ratten, wohingegen in unserer sowie in den Leber-Studien männliche Wistar-Ratten Anwendung fanden [45, 114, 120]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es Unterschiede zwischen Alter, Geschlecht, Rasse/Gattung und Vulnerabilität verschiedener Organe wie Leber, Knochen, Herz, Gehirn und Muskelgewebe gegenüber oxidativem Stress der verschiedenartigen Tiere gibt: Rikans et al. zeigten, dass ein Unterschied

zwischen männlichen und weiblichen Fischer-344-Ratten in der Malondialdehyd (MDA), ein wichtiger Biomarker für oxidativen Stress, besteht, wobei dieser bei den männlichen Tieren erhöht und bei den weiblichen Tieren im Verlauf der Alterung erniedrigt war [131]. Liu et al. konnten an Sprague-Dawley-Ratten aufzeigen, dass es bei einer akuten Stress-Situation zu einer Erhöhung des Malondialdehyd-Niveaus beispielsweise in der Leber- und im Gehirngewebe kam, wohingegen es bei einer chronischen Stress-Situation zu einer Reduktion der Malondialdehyd im Gehirngewebe kam [132]. Perez et al. und Barja et al. untersuchten Lungen-, Gehirn- und Lebergewebe von juvenilen und seneszenten Wistar-Ratten in Bezug auf das Malondialdehyd-Niveau nach oxidativem Stress, wobei sich kein altersabhängiger Unterschied der Tiere zeigte [133, 134]. Weitere Studien sind notwendig, um ein Tiermodell zu etablieren, welches oxidativen Stress im Hinblick auf Geschlecht, Alter, Gewebe, Rasse/Gattung sowie Genetik der Tiere untersucht sowie betrachtet, da oben genannte Studien zeigen, dass es inter- und intraindividuelle Unterschiede der Tiere gibt, welche wenn möglich beachtet werden sollten [132, 133]. Des Weiteren muss festgehalten werden, dass die zur Untersuchung der Leber-Knochen-Achse verwendeten seneszenten Ratten (23 Monate) nicht die wirklich gealterten Tiere ihrer Population widerspiegeln, da die wirklich gealterten Tiere labor- und tierhaltungstechnisch sowie finanziell nur schwer zu züchten und zu erwerben sind [135]. Die wirklich gealterten Tiere können ein Lebensalter von mehreren Jahren (> 4 Jahre) erreichen, was in Bezug auf Untersuchungen, welche die Tiere im Verlauf der Alterung betrachten, relevant ist [135].

#### **4.6 Leber-Knochen-Achse**

Insgesamt zeigt sich, dass die duale Rolle des NAC und der oxidative Stress in Form von Hitze mit altersbedingten Veränderungen, sowohl am Knochen als auch an der Leber zu finden sind. Diese Leber-Knochen-Achse zeigt in beiden Organen vergleichend im Verlauf der Alterung, dass es zu einer Leberdysfunktion und einem Knochendefekt kommt [45, 120]. Im Unterschied zum Knochen unterliegt die Leber jedoch einer enormen Regenerationsfähigkeit und verfügt als

das Stoffwechselorgan und Entgiftungsorgan des Körpers über suffiziente antioxidative Speicher [136].

#### **4.7 Weitere Untersuchungen und Limitierungen**

Ferner wäre es interessant gewesen, die Knochen im Verlauf der Alterung sowie den oxidativen Stress, auch organübergreifend, mit Hilfe von Imaging/Tracern und/oder (Bio-) Markern wie Thiobarbitursäure (TBARS), Malondialdehyd (MDA) oder neueren Markern wie Isoprostanen (IsoPs) und dessen Metaboliten zu messen, um genauer festzustellen, was für ein Stress-Level-Niveau in der knöchernen Integrität erreicht werden kann. Dies würde mit der Hitzestress-Behandlung korrelieren, da dadurch genauere Aussagen über die Wirkung der Hyperthermie, verbunden durch den oxidativen Effekt und somit letzten Endes über den Stoffwechselprozess des Knochens möglich gewesen wären [137]. Basu et al. konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress mit einer Erhöhung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (ein Abkömmling der Isoprostane als oxidativer Marker) und einer Abnahme in der Knochendichte besteht [7]. Mujahid et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass es unter Hitzestress-Behandlung zu einem Anstieg der Plasma- und mitochondrialen Konzentration an MDA mit einer Erhöhung der lipiden Peroxidation und einer Zunahme des oxidativen Schadens von Makromolekülen nach Hitzestress kommt [138]. Des Weiteren entstanden limitierende Grenzen durch die Leber-Knochen-Achse in unserer Studie, indem weitere Untersuchungen des Knochens auf zellulärer Ebene im Mikroenvironment des Knochens durch Lagerung und Fixierung der Ratten für die zuerst erfolgten Leber-Modelle/Studien für histologisch-pathologische Untersuchungen limitiert und ausgereizt waren.

#### **4.8 Konklusion und Ausblick**

Summa summarum konnte diese Studie zeigen, dass sich die Effekte der Alterung, des oxidativen Stresses sowie die Wirkung von NAC am Knochen nachweisen lassen. Diese Studie war eine Annäherung in Richtung des Zusammenspiels von oxidativem Stress unter dem dualen Einfluss von NAC im

Verlauf der Alterung in Bezug auf die Knochenstruktur. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um adäquaten Hitzestress am Knochen zu verursachen, oxidativen Stress am Knochen zu messen und deren Auswirkungen auf die knöcherne Integrität auf tiefergehenden Ebenen zu analysieren. Auf diese Weise könnten weitere Veränderungen auf enzymatischer und zellulärer Ebene untersucht werden, damit beispielsweise die potenziell altersbedingt verminderte Osteoblastogenese bei gleichzeitig verstärkter Osteoklastenaktivität und zunehmender Adipogenese im Tiermodell verifiziert werden kann [8, 9, 54]. Des Weiteren sollten auch andere mögliche Antioxidantien wie beispielsweise Resveratrol, Quercetin oder andere Antioxidantien als wissenschaftlich interessante Alternativen zu NAC untersucht werden [96-98, 101]. Ein effektiv wirkendes Antioxidans, welches oxidativen Stress reduziert sowie kontrolliert und somit einen günstigen Effekt beispielsweise auf den Verlauf der Alterung hätte, wäre durchaus ein Fortschritt, um beispielsweise die für den zellulären Alterungsprozess erhöhte Zellschädigung durch vermehrten oxidativen Stress ergänzend anti-oxidativ entgegenzuwirken [1, 48, 79]. Hierbei ist es unerlässlich organübergreifende Untersuchungen durchzuführen, um möglicherweise unterschiedliche Effekte an unterschiedlichen Organen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu betrachten. Zumal nicht nur Leber und Knochen wichtige Organsysteme darstellen, sondern auch neuronale und zerebrale Strukturen, insbesondere in Korrelation mit neurodegenerativen Erkrankungen [139-141]. Denn wie zuvor beschrieben zeigt sich, dass Stoffwechselveränderungen in wichtigen Organen und Strukturen wie Leber und Knochen nicht nur organbezogen, sondern organübergreifend untersucht werden sollten. Diese organübergreifende Bearbeitung und Sichtweise, ja vielleicht sogar eine multiorganübergreifende Betrachtungsweise, könnte zu einer besseren Beschreibung und Bewertung der wissenschaftlichen Forschung und Wirklichkeit, die reflektiert, vielschichtig und komplex sein kann, beitragen. Alles in allem sollten zukünftige Tiermodelle nachfolgende Faktoren wie die Spezies der Tiere in Bezug auf Alter, Geschlecht, Rasse/Gattung, Genetik, Stoffwechselprozess des jeweiligen Gewebes, die Applikation von oxidativem Stress in Form von beispielsweise Hitzestress durch Dauer und Intensität sowie



die Gabe einer antioxidativ wirkenden Substanz differenziert berücksichtigen. Denn dadurch könnte ein optimiertes und adäquates Tiermodell konstruiert und angepasst werden, um ein möglicherweise etablierbares Modell zu schaffen, das sich auch auf den Menschen übertragen ließe. Dies könnte für die Behandlung am Knochen zum Ziel haben, dass der Einsatz von NAC bei älteren Patienten mit Frakturen oder ossären Risikofaktoren einen präventiven oder gar therapeutischen Nutzen einnehmen würde. Diese Studie soll daher dem Verständnis dienen, inwieweit verursachte Schädigungen in Altersabhängigkeit am Knochen unter Berücksichtigung von NAC als Antioxidans durch oxidativen Stress in Form von Hitze sichtbar werden. Abschließend lässt sich sagen, was bereits der Begründer der empirisch-rationalen (wissenschaftlichen) Medizin und schon damaliger Bekämpfer des Alterns nämlich Hippokrates von Kos ca. 400 v. Chr. empfahl: „Wer stark, gesund und jung bleiben will, sei mäßig, übe den Körper, und atme reine Luft [142].“

## 5. Zusammenfassung

Das Altern ist ein multifaktorieller und vielschichtiger Prozess. Da die dazugehörigen Abläufe noch nicht vollständig verstanden sind und es bis dato keine allgemein akzeptierte wissenschaftliche Definition gibt, lassen sich Alterungsprozesse als universal, unumkehrbar, mit einer verminderten Funktions- und Anpassungsfähigkeit, genetisch-biologisch sowie psychisch-sozial determiniert in Grundzügen charakterisieren [25]. Als eine Ursache, welche auch schon 1956 durch Denham Harman in seiner „Theorie der freien Radikale“ postuliert wurde, wird die für den zellulären Alterungsprozess verantwortliche Zellschädigung durch vermehrten oxidativen Stress mit einem Ungleichgewicht zwischen schädigenden reaktiven Sauerstoffspezies und einem schützenden antioxidativen System beschrieben [37]. Die der Entstehung oxidativer Schäden zugrundeliegenden Mechanismen und deren Folgen für Alterungsprozesse im menschlichen Knochen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt [143]. Ziel dieser Studie war es, im Tiermodell die durch Seneszenz bedingten Veränderungen der knöchernen Integrität zu analysieren und einen altersabhängigen anti-oxidativen Effekt nach Gabe des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) auf die Knochenstruktur und Stabilität zu identifizieren [143]. Auf dieser Grundlage wurden männliche Wistar Ratten in 3 Altersgruppen (Alter: 8 Wochen = juvenil, 6/7 Monate = adoleszent, 24 Monate = seneszent) untersucht [143]. Zur Analyse des anti-oxidativen Effekts wurde zusätzlich adoleszenten und seneszenten Tieren oral und intraperitoneal NAC verabreicht [143]. Die unbehandelten Tiere dienten als Vergleichskontrollgruppe [143]. Die Ratten-Femura wurden bzgl. ihrer Knochenstruktur mittels  $\mu$ CT-Analyse und biomechanischer Stabilität im 4-Punktbiegetest untersucht [143]. Es zeigte sich, dass die juvenilen Knochen der Wistar Ratten signifikant kleiner waren und dass sie eine dicke und eng vernetzte trabekuläre Struktur im Vergleich zu den beiden älteren Gruppen aufwiesen [143]. Die adoleszenten Knochen waren signifikant am längsten und zeigten die höchste Knochendichte, wohingegen seneszente Knochen sowohl an Länge als auch an Knochendichte verloren [143]. Unter dem Einfluss des Antioxidans NAC nahm die trabekuläre Struktur im adoleszenten Knochen ab, was auf einen tendenziell pro-oxidativen Effekt hinwies [143].

Am seneszenten Knochen hingegen schien NAC anti-oxidativ zu wirken mit vermehrter und dichterem trabekulärer Struktur [143]. Somit zeigte sich mit zunehmender Knochenalterung eine verminderte trabekuläre Struktur, die sich in der Seneszenz möglicherweise durch entsprechend anti-oxidative Therapie verbessern lassen würde [143]. Weitere Analysen auf zellulärer Ebene im Mikroenvironment des Knochens wären wichtig und interessant, um die potentiell altersbedingte verminderte Osteoblastogenese bei gleichzeitig verstärkter Osteoklastenaktivität und zunehmender Adipogenese im Tiermodell zu verifizieren [143]. Ferner könnten zukünftige Tiermodelle Faktoren wie die Spezies der Tiere bezüglich Alter, Geschlecht, Rasse/Gattung, Genetik, Stoffwechselprozess des jeweiligen Gewebes und die Applikationsformen mit Dauer und Intensität sowie die Gabe einer antioxidativ wirkenden Substanz differenziert berücksichtigen, um ein optimiertes Tiermodell zu schaffen. Folgestudien könnten als Grundlage zur Analyse einer möglichen klinischen Anwendung von Antioxidantien zur knöchernen Protektion durch Alterungsprozesse verwendet werden, sofern man über eine individualisierte, patientenorientierte (*personalized-medicine*) Applikation von NAC zur Verbesserung der Knochenstruktur nachdenkt [143]. Hierbei ist kritisch zu differenzieren, in welchem Altersstadium sich der Knochen befindet, da Antioxidantien möglicherweise einen altersabhängig-gegensätzlichen und somit dualen Effekt auf die Knochenintegrität nehmen können [143].

## 6. Literaturverzeichnis

\* Studien der eigenen Arbeitsgruppe

1. Almeida M., O'Brien C., *Basic Biology of Skeletal Aging: Role of Stress Response Pathways*. Journals of Gerontology: Biological Sciences. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt079> [Zugriff 11.10.2017], 2013.
2. Kang S., Bennett C., Gerin I., Rapp L., Hankenson K., Macdougald O., *Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. Journal of Biol. Chem. 282:14515–14524, 2007.
3. Okamura M., Kudo H., Wakabayashi K., Tanaka T., Nonaka A., Uchida A., Tsutsumi S., Sakakibara I., Naito M., Osborne T., Hamakubo T., Ito S., Aburatani H., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., *COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 10.1073/pnas.0901676106, 2009.
4. Shelly C., *Glutathione synthesis*. Biochim. Biophys. Acta. 10.1016/j.bbagen.2012.09.008, 2012.
5. Wu G., Fang Y., Lupton J., Turner N., *Glutathione metabolism and its implications for health*. J. Nutr. 14988435, 2004.
6. Almeida M., *Aging mechanisms in bone*. Nature: BoneKey Reports. 10.1038/bonekey.2012.102, 2012.
7. Basu S., Michaelsson K., Olofsson H., Johansson S., Melhus H., *Association between Oxidative Stress and Bone Mineral Density*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10.1006/bbrc.2001.5747, 2001.

8. Almeida M., Han L., Ambrogini E., Bartell S., Manolagas S., *Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- $\kappa$ B in osteoblastic cells via a PKC $\beta$ /p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens.* Mol. Endocrinol. 24:2030–2037, 2010.
9. Almeida M., Ambrogini E., Han L., Manolagas S., Jilka R., *Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton.* Journal of Biol. Chem. 284:27438–27448, 2009.
10. Shakibaei M., Buhrmann C., Mobasheri A., *Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) activation of NF- $\kappa$ B signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells.* J. Biol. Chem. 10.1074/jbc.M110.198713, 2011.
11. Wang X., Kua H., Hu Y., Guo K., Zeng Q., Wu Q., *p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis and bone remodeling.* J. Cell. Biol. 10.1083/jcb.200507106, 2006.
12. Schosserer M., Grubeck-Lobenstein B., Grillar J., *Grundlagen der biologischen Alterung.* Z. Gerontol. Geriat. 10.1007/s00391-015-0857-4, 2015.
13. Pijnenburg M., Leget C., *Who wants to live forever? Three arguments against extending the human lifespan.* J. Med. Ethics, PMID: PMC2652797, 2007.
14. Vaupel J., Kistowski K., *Der bemerkenswerte Anstieg der Lebenserwartung und sein Einfluss auf die Medizin.* Max-Planck-Institut für demografische Forschung, Rostock. 10.1007/s00103-005-1043-4, 2005.

15. Schmähl W., *Steigende Lebenserwartung und soziale Sicherung: Tendenzen, Auswirkungen und Reaktionen*. University of Bremen, Centre for Social Policy Research (ZeS). <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0168-ssoar-116921> [Zugriff 11.10.2017], 1999.
16. National Institute of Health, *Global Health and Aging*. NIH. <https://www.nia.nih.gov/research/dbsr/global-aging> [Zugriff 11.10.2017], 2011.
17. Egeler R., Sommer B., Pötzsch O., Pötzsch K., *Bevölkerungsentwicklung Deutschlands bis 2060. Die 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*. Statistisches Bundesamt Deutschland. [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Bevoelkerung/VorausberechnungBevoelkerung/BevoelkerungDeutschland2060Presse5124204159004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Bevoelkerung/VorausberechnungBevoelkerung/BevoelkerungDeutschland2060Presse5124204159004.pdf?__blob=publicationFile) [Zugriff 11.10.2017], 2015.
18. Schwartz F., *Public Health - Gesundheit und Gesundheitswesen*. Elsevier, Urban & Fischer, 6. Ausgabe. 3437222600, 978-3437222603, 2003.
19. Kaeberlein M., Rabinovitch P., Martin G. M., *Healthy aging: The ultimate preventative medicine*. Science, Vol. 10.1126/science.aad3267, 2015.
20. Baltes P. B., Mittelstraß J., Staudinger U. M., *Alter und Altern: Ein interdisziplinärer Studientext zur Gerontologie*. Verlag Walter de Gruyter. 3110144085, 978-3110144086, 1994.
21. Türk J., *Theoretische Alternsmechanismen II*. Technische Universität Kaiserslautern. <https://kluedo.ub.uni-kl.de/frontdoor/index/index/year/2003/docId/1423> [Zugriff 11.10.2017], 2003.
22. Strehler B., *Time, cells and aging*. Academic Press, 2. Ausgabe. 0-12-673260-4, 1977.

23. Baltes P., Mittelstraß J., *Zukunft des Alterns und gesellschaftliche Entwicklung*. Verlag Walter de Gruyter, Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 978-3-11-013248-9, 1992.
24. Evert R., Langenfeld-heyser R., *Esau Pflanzenanatomie*. Verlag Walter de Gruyter. 978-3-11-021132-0, 2009.
25. Dickhuth H., *Sportmedizin für Ärzte*. Deutscher Ärzteverlag. 978-3-7691-0472-1, 2007.
26. Tostlebe M., *Disproportionalität der Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe im Myokard und in der Skelettmuskulatur im Alter*. Dissertation: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. [https://sun.doc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H114/of\\_index.htm](https://sun.doc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H114/of_index.htm) [Zugriff 11.10.2017], 2005.
27. Schmidt R., Lang F., Thews G., *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag. 3-540-21882-3, 2005.
28. Brandenburg U., Domschke P., *Altern ist keine Krankheit*. Verlag Gabler. 10.1007/978-3-8349-9532-2\_4, 2007.
29. Smith R., *In search of "non-disease"*. British Medical Journal. 10.1136/bmj.324.7342.883, 2002.
30. Lange N., *Alternsvorstellungen und Rehabilitation bei Hochaltrigen Pflegeheimbewohnern*. GRIN Verlag. 978-3-638-74293-1, 2007.
31. Batoni P., *Die Zeit befiehlt dem Alter, die Schönheit zu zerstören*. Nationale Galerie, London. 021796, 1746.

32. Drenckhahn D., Waschke J., *Taschenbuch Anatomie Benninghoff*. Urban & Fischer, Elsevier GmbH, 2. Auflage, 2008.
33. Lüllmann-Rauch R., Paulsen F., *Taschenlehrbuch Histologie*. Verlag Thieme, 4. Auflage. 313129244X, 978-3131292445, 2012.
34. Fontana J., *Metabolism of Bone and its Remodeling*. Universität Prag, Functions of Cells and Human Body, <http://fbt.cz/en/skripta/iv-pohybova-soustava/3-metabolismus-a-remodelace-kostni-tkane/> [Zugriff 18.11.2017], 2017.
- \*35. Pscherer S., Sandmann G., Ehnert S., Nussler A., Stöckle U., Freude T., *Delayed Fracture Healing in Diabetics with Distal Radius Fractures*. Acta. Chir. Orthop. Traumatol. Cech. 10.15496/publikation-9876, 2015.
- \*36. Holzer N., Braun K., Ehnert S., Egana J., Schenck T., Buchholz A., Schyschka L., Neumaier M., Benzing S., Stöckle U., Freude T., Nussler A., *Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication*. Langenbecks Arch. Surg. 10.1007/s00423-011-0882-8, 2012.
37. Harman D., *Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry*. Journal of Gerontology. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298> [Zugriff 11.10.2017], 1956.
38. Liochev S., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. Free Radic. Biol. Med. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011, 2013.
39. Cadenas E., Davies K., *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging*. Free Radic. Biol. Med. 10.1016/S0891-5849(00)00317-8, 2000.



40. Lee H., Wei Y., *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging*. Exp. Biol. Med. 17463155, 2007.
41. Eckert G., Wegat T., Schaffer S., Theobald S., Müller W. E., *Oxidativer Stress: Apothekenrelevante Messmethoden*. Pharmazeutische Zeitung, Ausgabe 24/2006. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1418> [Zugriff 11.10.2017], 2006.
42. Biesalski H., *Free radical theory of aging*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 11790942, 2002.
43. Wei Y., Lu C., Lee H., Pang C., Ma Y., *Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function*. Ann N. Y. Acad. Sci. 9928427, 1998.
44. Wei Y., Wu S., Ma Y., Lee H., *Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging*. Chang Gung Med. J. 19403001, 2009.
- \*45. Fischer L., *Changes in the antioxidant system in the rat liver - Aging heat stress and the impact of NAC*. Diplomarbeit: Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät Tübingen, Fach Biochemie, 2014.
46. Qiu S., Rao D., Palnitkar S., Parfitt A., *Age and distance from the surface but not menopause reduce osteocyte density in human cancellous bone*. Bone. [http://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00819-0](http://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00819-0) [Zugriff 11.10.2017], 2002.
47. Busse B., Djonc D., Milovanovic P., *Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone*. Aging Cell. 10.1111/j.1474-9726.2010.00633.x, 2010.

48. Balaban R., Nemoto S., Finkel T., *Mitochondria, oxidants and aging*. Cell. 120:483–495, 2005.
49. Kudryavtseva A., Krasnov G., Dmitriev A., Alekseev B., Kardymon O., Sadritidinova A., Fedorova M., Pokrovsky A., Melnikova N., Kaprin A., Moskalev A., Snezhkina A., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer*. Oncotarget. 10.18632/oncotarget.9821, 2016.
50. Sahin E., DePinho R., *Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing*. Nature. 10.1038/nature08982, 2010.
51. Calnan D., Brunet A., *The FoxO code*. Oncogene. 2008;27:2276–2288, 2008.
52. Ambrogini E., Ambrogini M., Martin-Millan M., Paik J., DePinho R., Han L., *FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice*. Cell Metab. 2010;11:136–146, 2010.
53. Rached M., Kode A., Xu L., Yoshikawa Y., Paik J., DePinho R., *FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts*. Cell Metab. 10.1016/j.cmet.2010.01.001, 2010.
54. Almeida M., Han L., Martin-Millan M., Manolagas S., *Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription*. J. Biol. Chem. 2007;282:27298–27305, 2007.

55. Manolagas S., Aleimda M., *Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid and glucose metabolism.* Mol. Endocrinol. 10.1210/me.2007-0259, 2007.
56. Lecka-Czernik B., Rosen C., Kawai M., *Skeletal aging and the adipocyte program: new insights from an "old" molecule.* Cell Cycle, 9:3648–3654, 2010.
57. Akune T., Kamekura S., Yamaguchi M., Chung U., Kubota N., Terauchi Y. et al., *PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors.* J. Clin. Invest. 10.1172/JCI19900, 2004.
58. Song L., Liu M., Ono N., Bringhurst F., Kronenberg H., Guo J., *Loss of wnt/ $\beta$ -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes.* Journal of Bone Miner. Res. 27:2344–2358, 2012.
59. Brodeur M., Brissette L., Falstraull L., Quellet P., Moreau R., *Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells.* Free Radic. Biol. Med. 2008;44:506–517, 2008.
60. Klein B., Rojansky N., Ben-Yehuda A., Abou-Atta I., Abedat S., Friedmann G., *Cell death in cultured human Saos2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein.* J. Cell Biochem. 10.1002/jcb.10603, 2003.
61. Huang M., Morony S., Lu J., Zhang Z., Bezouglaia O., Tseng W., *Atherogenic phospholipids attenuate osteogenic signaling by BMP-2 and parathyroid hormone in osteoblasts.* J. Biol. Chem. 0.1074/jbc.M701341200, 2007.

62. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M., *Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells*. Bone. 14678851, 2003.
63. Sethe S., Scutt A., Stolzing A., *Aging of mesenchymal stem cell aging*. Ageing Res. Rev. 10.1016/j.arr.2005.10.001, 2006.
64. Kasper G., Mao L., Geissler S., Draycheva A., Trippens J., Kühnisch J., Tschirrmann M., Kaspar K., Perka C., Duda G., Klose J., *Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton*. Stem Cells. 10.1002/stem.49, 2009.
65. Caplan A., *Mesenchymal stem cells*. J. Orthop. Res.10.1002/jor.1100090 504, 1991.
66. Lengner C., Steinmann H., Gagnon J., Smith T., Henderson J., Kream B., *Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling*. J. Cell Biol. 10.1083/jcb.200508130, 2006.
67. Sahin E., Colla S., Liesa M., Moslehi J., Muller F., Guo M., *Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise*. Nature. 10.1038/nature09787, 2011.
68. Trinei M., Beltrami E., Migliaccio E., Fassina A., Pelicci P., *P66Shc signals to age*. Aging. 10.18632/aging.100057, 2009.
69. Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., *Electron transfer between cytochrome c and p66shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis*. Cell. 10.1016/j.cell.2005.05.011, 2005.

70. Bartel S., Han L., Iyer S., Warren A., Bradsher R., Shelton R., *Deletion of the redox amplifier p66shc decreases ROS production in murine bone and increases osteoblast resistance to oxidative stress and bone mass.* J. Bone Miner. Res. 10.1038/bonekey.2012.102, 2011.
71. Bai X., Lu D., Zhang Z., Li X., Zou Z., Zeng W., Cheng B., Luo S., *Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast.* J. Biol. Chem. 29;280(17):17497-506, 2005.
72. Boyle W., Simonet S., Lacey D., *Osteoclast differentiation and activation.* Nature. 10.1038/nature01658, 2003.
73. Matthew W., Yongwon C., *Biology of the trance axis.* Cytokine and Growth Factor Reviews. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00027-3) [Zugriff 11.10.2017], 2003.
74. Lean J., Davies J., Fuller K., Jagger C., Kirstein B., Partington G., Urry Z., Chambers T., *A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss.* Journal of Clinical Investigation. 10.1172/JCI18859, 2003.
75. Fraser J., Helfrich M., Wallace H., Ralston S., *Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae.* Bone. 10.1016/8756-3282(96)00177-9, 1996.
76. Garrett J., Boyce B., Oreffo R., Bonewald L., Poser J., Mundy G., *Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo.* J. Clin. Invest. 10.1172/JCI114485, 1990.
77. Davies K., *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal repair, and replacement systems.* IUBMB Life. 10.1080/713803728, 2000.

78. Sadowska-Bartosz I., Bartosz G., *Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity*. Biomed. Res. Int. 10.1155/2014/404680, 2014.
79. Finkel T., Holbrook J., *Oxidants, oxidative stress and the biology of aging*. Nature. 10.1038/35041687, 2000.
80. Löffler G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag, 7. Auflage. 978-3-540-76511-0, 2008.
81. Emminger H., *Physikum EXAKT: Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP*. Georg Thieme Verlag KG, 4. Auflage, 2005.
82. Griffith O., *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radic Biol Med. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8) [Zugriff 11.10.2017], 1999.
83. Baudouin-Cornu P., Lagniel G., Kumar C., Kumar M., Labarre L., *Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis*. Journal of Biol. Chem. 287(7):4552-61, 2012.
84. Taverne Y., Boger A., Duncker D., Merkus D., *Reactive oxygen species and the cardiovascular system*. Oxid. Med. Cell Longev. 2013:862423, 2013.
85. Bagchi D., Bagchi M., Stohs S., Ray S., Kuszynski C., Joshi S., Pruess H., *Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention*. Toxicology. 10962138, 2000.
86. Sandoz Pharmaceuticals GmbH, *Fachinformation NAC*. Ratiopharm GmbH. <http://www.ratiopharm.de/index.php?eID=dumpFile&f=39240&g=-1&r=1894,1894&t=f&token=91bcfaf468d7034ec30f8233585791db7ac84562> [Zugriff 11.10.2017], 2011.

87. Hekmat N., Cicek D., *Fortbildungstelegramm Pharmazie: Acetylcystein (ACC)*. 7. Jahrgang, 2. Ausgabe, Universität Düsseldorf. [https://www2.hhu.de/kojdapharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildung\\_sartikel/ACC\\_fuer\\_FortePharm\\_2013.pdf](https://www2.hhu.de/kojdapharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildung_sartikel/ACC_fuer_FortePharm_2013.pdf) [Zugriff 11.10.2017], 2013.
88. Atkuri K., Mantovani J., Herzenberg L., *N-acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency*. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10.1016/j.coph.2007.04.005, 2007.
89. Xu R., Tai A., Bai Y., Deng Y., Chen G., *Effectiveness of N-Acetylcysteine for the Prevention of Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *J. Am. Heart Assoc.* 10.1161/JAHA.116.003968, 2016.
90. Ellegaard P., Licht R., Poulsen H., Nielsen R., Berk M., Dean O., Mohebbi M., *Add-on treatment with N-acetylcysteine for bipolar depression: a 24-week randomized double-blind parallel group placebo-controlled multicentre trial (NACOS-study protocol)*. *Int. Bipolar Disord.* 10.1186/s40345-018-0117-9, 2018.
91. Hasebe K., Gray L., Bortolasci C., Panizzutti B., Mohebbi M., Kidnapillai S., Spolding B., Walder K., Berk M., Malhi G., Dodd S., Dean O., *Adjunctive N-acetylcysteine in depression: exploration of interleukin-6, C-reactive protein and brain-derived neurotrophic factor*. *Acta Neuropsychiatr.* 10.1017/neu.2017.2, 2017.
92. Rossell S., Francis P., Galletly C., Harris A., Siskind D., Berk M., Dark F., Liu D., Meyer D., Neill E., Castle D., *N-acetylcysteine (NAC) in schizophrenia resistant to clozapine: a double blind randomised placebo controlled trial targeting negative symptoms*. *BMC Psychiatry.* 10.1186/s12888-016-1030-3, 2016.

93. Seixas E., Gozzelino R., Chora A., *Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria*. Proc. Natl. Acad. Sci. 10.1073/pnas.0903419106, 2009.
94. Ducret E., Puaud M., Lacoste J., Belin-Rauscent A., Fouyssac M., Dugast E., Murray J., Everitt B., Houeto J., Belin D., *N-Acetylcysteine facilitates self-Imposed Abstinence after escalation of cocaine intake*. Biol. Psychiatry. 10.1016/j.biopsych.2015.09.019, 2015.
95. Sagrista M., Garcia A., Mora M., *Antioxidant and prooxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation*. Free Radic Res. 10.1080/10715760290019354, 2009.
96. Kaplan A., *Einfluss des Flavonoids Quercetin auf den mTOR-Signalweg von Zervix- und Mammakarzinomzellen*. Dissertation. München: Medizinische Fakultät Ludwig-Maximilians Universität. 1048361322, 2014.
- \*97. Braun K., Ehnert S., Freude T., Egana J., Schenck T., Arne B., Schmitt A., Siebenlist S., Schyschka L., Neuermaier M., Stöckle U., Nussler A., *Quercetin Protects Primary Human Osteoblasts Exposed to Cigarette Smoke through Activation of the Antioxidative Enzymes HO-1 and SOD-1*. Scientific World Journal. 10.1100/2011/471426, 2011.
98. Wattel A., Kamel S., Prouillet C., *Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1*. Journal of Cellular Biochemistry. 10.1002/jc b.20071, 2004.



99. Malhotra A., Sundeep B., Fawzy E., *An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol*. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2015:803971, 2015.
100. Backesjo C., Li Y., Lindgren U., Haldosen L., *Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells*. *J. Bone Miner. Res.* 10.1359/jbmr.060415, 2006.
101. Tseng P., Hou S., Chen R., Peng H., Hsieh C., Kuo M., *Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis*. *J. Bone Miner. Res.* 10.1002/jbmr.460, 2011.
102. Flanagan S., Moseley P., Buettner G., *Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping*. *FEBS Letters.* 10.1016/S0014-5793(98)00779-0, 1998.
103. Slimen I., Najar T., Ghram A., Dabbebi H., Ben-Mrad M., Abdrabbah M., *Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage*. *Int. J. Hyperthermia.* 10.3109/02656736.2014.971446, 2014.
104. Semenza J., Rubin C., Falter K., Selanikio J., Flanders W., Howe H., Wilhelm J., *Heat-related deaths during the July 1995 heat wave in Chicago*. *N. Engl. J. Med.* 10.1056/NEJM199607113350203, 1996.
105. Vandentorren S., Bretin P., Zeghnoun A., Mandereau-Bruno L., Croisier A., Cochet C., Riberon J., Siberan I., Declercq B., Ledrans M., *August 2003 heat wave in France: risk factors for death of elderly people living at home*. *Eur. J. Public Health.* 10.1093/eurpub/ckl063, 2006.

106. Vanhems P., Gambotti L., Fabry J., *Excess rate of in-hospital death in Lyons, France, during the August 2003 heat wave*. N. Engl. J. Med. 10.1056/NEJM200311203492120, 2003.
107. Conti S., Meli P., Minelli G., Solimini R., Toccaceli V., Vichi M., Beltrano C., Perini L., *Epidemiologic study of mortality during the Summer 2003 heat wave in Italy*. Environ Res. 10.1016/j.envres.2004.10.009, 2005.
108. Kenney W., Alexander L., *Heat waves, aging, human cardiovascular health*. Medicine and science in sports and exercise, Med. Sci. Sports Exerc. 10.1249/MSS.0000000000000325, 2014.
109. Ristow M., Schmeisser K., *Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by increased levels of Reactive Oxygen Species (ROS)*. Dose Response. 10.2203/dose-response.13-035.Ristow, 2014.
110. Yang L., Tang G., Fu Y., Feng J., Zhang M., *Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens*. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. 10.1016/j.cbpc.2009.10.010, 2010.
111. Lundskog J., *Heat and bone tissue. An experimental investigation of the thermal properties of bone and threshold levels for thermal injury*. Scand. J. Plastic Reconstr. Surg. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785\(82\)80020-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9785(82)80020-3) [Zugriff 11.10.2017], 1972.
112. Eriksson A., Albrektsson T., *Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit*. J. Prosthet. Dent. 10.1016/0022-3913(83)90174-9, 1983.

113. Hayflick L., *Biological aging is no longer an unsolved problem*. Ann N. Y. Acad Sci. 10.1196/annals.1395.001, 2007.
114. Zhang H., Xu K., Drake V., Xie L., Oberley L., Kregel K., *Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation*. FASEB Journal. 10.1096/fj.03-0139fje, 2003.
115. Simon D., Derer A., Andes F., Lezuo P., Bozec A., Schett G., Herrmann M., Harre U., *Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis*. Bone. 10.1016/j.bone.2017.08.013, 2017.
116. Pathare G., Föllner M., Michael D., Walker B., Hierlmeier M., Mannheim J., Pichler B., Lang F., *Enhanced FGF23 Serum Concentrations and Phosphaturia in Gene Targeted Mice Expressing WNK-Resistant Spak*. Kidney Blood Press. Res. 10.1159/000343393, 2012.
117. Fahkri H., Zang B., Fajol A., Hernando N., Elvira B., Mannheim J., Pichler B., Daniel C., Amann K., Hirao A., Haight J., Mak T., Lang F., Föllner M., *Checkpoint kinase Chk2 controls renal Cyp27b1 expression, calcitriol formation, and calcium-phosphate metabolism*. Eur. J. Physiol. 10.1007/s00424-014-1625-9, 2014.
118. Hahn M., Dellinger G., *Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture*. Bone. 1389573, 1992.
119. Zanker D., *Computertomographische Untersuchungen zur Spongiosastruktur der Facettengelenke an Hals- und Lendenwirbelsäule*. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm, Prof. Dr. H. Wilke, 2011.

- \*120. Wagner C., *Age-related differences in stress response: Increase markers for oxidative stress and liver damage after heat stress in aged rats?* Dissertation. Tübingen: Siegfried-Weller-Institut für Unfallmedizinische Forschung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik. Medizinische Fakultät Eberhard Karls Universität, 2016.
121. Saez G., Thronalley P., Hill H., Hems R., Bannister J., *The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes.* Biochim. Biophys. Acta. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90302-6) [Zugriff 11.10.2017], 1982.
122. Betteridge D., *What is oxidative stress?* Metabolism. 10.1016/S0026-0495(00)80077-3, 2000.
123. Finn N., Kemp M., *Pro-oxidant and antioxidant effects of N-acetylcysteine regulate doxorubicin-induced NF-kappa B activity in leukemic cells.* Mol. Biosyst. 10.1039/C1MB05315A, 2012.
124. Sanders Y., Liu H., Zhang X., *Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress.* Redox Biology. 10.1016/j.redox.2012.11.004, 2013.
125. Tominaga K., *The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology.* Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases. 10.3402/pba.v5.27743.2774, 2015.
126. Ziegler D., Wiley C., Velarde M., *Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging.* Aging Cell. 10.1111/accel.12287, 2015.

127. Correia-Melo C., Passos J., *Mitochondria: are they causal players in cellular senescence?* . Biochim. Biophys. Acta. 10.1016/j.bbabi.2015.05.017, 2015.
128. Liang C., Barnes J., Seedor J., Quartuccio H., Jeffry J., Rodan G., *Impaired bone activity in aged rats: Alterations at the cellular and molecular levels.* Bone. 10.1016/8756-3282(92)90087-D, 1992.
- \*129. Nussler A. K., Wildemann B., Freude T., Litzka C., Soldo P., Friess H., Hammad S., Hengstler J., Braun K., Trak.Smayra V., Godoy P., Ehnert S., *Chronic CCl4 intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis.* Arch. Toxicol. 10.1007/s00204-013-1191-5, 2014.
130. Lin S., Huang J., Fu Z., Liang Y., Wu H., Xu L., Sun Y., Lee W., Wu T., Quin L., Cui L., Li G., *The effects of atorvastatin on the prevention of osteoporosis and dyslipidemia in the high-fat-fed ovariectomized rats.* Calcif. Tissue Int. 10.1007/s00223-015-9975-7, 2015.
131. Rikans L., Moore D., Snowden C., *Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver.* Biochem. Biophys. Acta. 10.1016/0304-4165(91)90061-K, 1991.
132. Liu J., Yeo H., Övervik-Douki E., Hagen T., Doniger S., Chu D., Brooks G., Ames B., *Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants.* Journal of Applied Physiology. 10904031, 2000.
133. Pérez R., Lopez M., Barja de Quiroga G., *Aging and lung antioxidant enzymes, glutathione and the lipid peroxidation in the rat.* Free Radical Biology and Medicine. 10.1016/0891-5849(91)90019-Y, 1991.

134. Barja de Quiroga G., Perez-Campo R., Lopez Torres M., *Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats*. Biochem. Journal. 10.1042/bj2720247, 1990.
135. Janvier Labs, Rodant Research Models & Associated Services, *Wistar-Ratte*. J Labs. <https://www.janvier-labs.com/kontakt/kontaktformular.html> [Zugriff 11.10.2017], 2017.
136. Song Z., Gupta K., Ng I., Xing J., Yang Y., Yu H.,, *Mechanosensing in liver regeneration*. Semin Cell Dev Biol. 10.1016/j.semcd.2017.07.041, 2017.
137. Czerska M., Mikolajewska K., Zielinski M., Gromadzinska J., Wasowicz W., *Today's oxidative stress markers*. Med. Pr. 10.13075/mp.5893.00137, 2015.
138. Mujahid A., Pumpford N., Bottje W., Nakagawa K., Miyazawa T., Akiba Y., Toyomizu M., *Mitochondrial Oxidative Damage in Chicken Skeletal Muscle Induced by Acute Heat Stress*. The Journal of Poultry Science. <http://doi.org/10.2141/jpsa.44.439> [Zugriff 11.10.2017], 2007.
139. Swomley A., Butterfield D., *Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics*. Arch. Toxicol. 10.1007/s00204-015-1556-z, 2015.
140. Tramutola A., Lanzillotta C., Perluigi M., Butterfield D., *Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease*. Brain Res. Bull. 10.1016/j.brainresbull.2016.06.005, 2016.
141. Rokad F., Moseley R., Hardy R., Chukkapalli S., Crean S., Kesavalu L., Singhrao S., *Cerebral Oxidative Stress and Microvasculature Defects in TNF- $\alpha$  Expressing Transgenic and Porphyromonas gingivalis-Infected ApoE<sup>-/-</sup> Mice*. J. Alzheimer Dis. 10.3233/JAD-170304, 2017.

142. Flashar H., *Hippokrates - Meister der Heilkunst*. Beck. 978-3-406-69746-3, 2016.
- \*143. Siemens C., Reumann M., Ehnert S., Mannheim J., Ernst M., Gueorguiev B., Freude T., Nussler A., *Veränderte knöcherner Integrität über den Verlauf der Alterung im Tiermodell – duale Rolle des Antioxidans NAC*. Meeting Abstract, Vortrag, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2016). 10.3205/16dkou521, 2016.
144. Atkuri K., Mantovani J., Herzenberg L., *N-acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency*. *Curr. Opin. Pharma.* 7(4):355-9, 2007.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung zu Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. A. Nüssler und Frau Dr. M. Reumann durchgeführt.

Die Durchführung der Hitzestressexperimente, die Behandlung mit NAC sowie die Bereitstellung des Unterleibs der Ratten und somit der Knochen erfolgte durch die Pharmacelsus GmbH (Saarbrücken, Deutschland). Die Präparation der Tiere wurde von mir mit der Unterstützung durch Frau Dr. M. Reumann durchgeführt. Die Umsetzung der biomechanischen Stabilitätsmessungen der Knochen erfolgte am *AO Research Institute* Davos, Schweiz. Die Mikro-Computertomographie und Auswertung dieser erfolgte von mir am Werner Siemens Imaging Center Tübingen unter der Betreuung von Frau Dr. J. Mannheim. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. M. Reumann sowie Frau Dr. S. Ehnert durch mich.

Ich versichere diese Dissertation selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Zu dem versichere ich die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Arbeit und den wissenschaftlichen Umgang, was Verhalten und Fehlverhalten wissenschaftlicher Praxis an der Eberhard Karls Universität beachtet zu haben.

Ich erkläre außerdem, diese hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht zu haben und dass diesem Promotionsverfahren keine gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.



## **8. Veröffentlichungen**

### Vortrag:

Siemens C., Reumann M., Ehnert S., Mannheim J., Ernst M., Gueorguiev B., Freude T., Nussler A., Veränderte knöcherner Integrität über den Verlauf der Alterung im Tiermodell – duale Rolle des Antioxidans NAC. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2016), Berlin, 25.-28.10.2016.

URL [Stand: 08.06.2017, 16:32 Uhr]:

<http://www.egms.de/static/en/meetings/dkou2016/16dkou521.shtml>

Doi: 10.3205/16dkou521, Urn:nbn:de:0183-16dkou5211

## **9. Danksagung**

Ich möchte an dieser Stelle meinen besonderen Dank an die nachstehenden Personen richten, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre:

Zuerst gilt der Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Andreas Nüssler und dem Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung für die Betreuung, die Bereitstellung aller Ressourcen, die große Hilfe bezüglich der Auseinandersetzung mit diesem Themenkomplex und die geduldige Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke auch Frau Professor Dr. Sandra Beer-Hammer für die Betreuung und Auseinandersetzung mit dieser Arbeit als Zweitgutachterin.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Marie Reumann als vorbildliche Betreuerin, Klinikerin, Forscherin, Mutter und Ehefrau, für Ihre mühevollen Geduld und Unterstützung, immense Hilfe sowie Ideengebung und dem kritisch-intellektuell-konstruktiven Austausch sowohl auf fachlicher als auch persönlicher Ebene.

Ferner danke ich Frau Dr. Sabrina Ehnert für die Hilfestellungen und interessanten Gespräche.

Des Weiteren gilt mein außerordentlicher Dank dem Werner Siemens Imaging Center unter der Betreuung durch Frau Dr. Julia Mannheim für die freundliche Hilfe und ständige Bereitschaft zur Unterstützung sowie den konstruktiven Austausch und Input.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Freundin, Alina Köhler, für ihre Hilfe und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Studienkollegen\*innen und Freunden, insbesondere bei Philipp Bornemann, Laura Brinkmüller sowie Carina Finklenburg für ihre Ausdauer, Ruhe, Geduld sowie Unterstützung auf diesem gemeinsamen Lebensweg.