

**Klinik für Unfallchirurgie**  
(Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Seekamp)  
**im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel**  
**an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**DER EINFLUSS DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS  
NUCLEAR FACTOR- E2 P25- RELATED FACTOR 2 AUF DIE  
FRAKTURHEILUNG DER MAUS**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**FERDA AYUB-ÖZDOGRU**  
aus  
Bremerhaven

Kiel 2013

1. Berichterstatter: PD. Dr. med. S. Lippross  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wedel  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2013  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.06.2013

gez. Prof. Dr. Seekamp  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

**Meinen Eltern,  
meinem Mann  
und meinen Kindern.**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1-7</b>
1.1	Fraktur und Frakturheilung.....	1
1.2	Molekularbiologie der Frakturheilung.....	2
1.3	Komplikationen der Frakturheilung.....	3
1.4	Frakturheilung in der Literatur.....	3
1.5	Nrf2 und seine Wirkung.....	5
1.6	Studienziel.....	7
 <b>2</b>	 <b>Material und Methoden.....</b>	 <b>7-21</b>
2.1	Tierversuchsgenehmigung.....	7
2.2	Einteilung der Versuchsgruppen.....	8
2.3	Versuchsdauer.....	8
2.4	Versuchstiere.....	8
2.5	Frakturmodell.....	8
2.6	Versuchsablauf.....	9
2.7	Bildgebung.....	11
2.7.1	Röntgen.....	11
2.7.2	Mikro-CT.....	12
2.7.3	DXA-Scan.....	13
2.8	Histologie.....	15
2.8.1	Entkalkifizierte Histologie.....	15
2.8.2	Kalkifizierte Histologie.....	15
2.8.3	Mikroradiographie.....	17
2.8.4	Färbung mit O-Toluidinblau.....	17
2.8.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	17
2.9	Statistische Auswertung.....	18
2.10	Liste der verwendeten Materialien.....	18
 <b>3</b>	 <b>Ergebnisse.....</b>	 <b>21-33</b>
3.1	Mikro-CT.....	21
3.1.1	Erste Untersuchung, nach zwei Wochen.....	21
3.1.2	Zweite Untersuchung, nach vier Wochen.....	22

3.2 DXA- Knochenscan.....	26
3.2.1 BMD.....	26
3.2.2 BMC.....	28
3.2.3 Fläche.....	30
3.3 Histologie.....	32
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>34-38</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>38-39</b>
<b>6 Referenzen.....</b>	<b>40-42</b>
<b>7 Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen.....</b>	<b>43</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>44-45</b>
<b>9 Tierversuchsgenehmigung.....</b>	<b>46-49</b>
<b>10 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>50</b>
<b>11 Curriculum vitae.....</b>	<b>51-52</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARE	antioxidant response element
BMC	bone mineral content
BMD	bone mineral density
BMP- 2	bone morphogenetic protein 2
BV	bone volume
C	Celsius
ca.	Zirka
CAU	Christian- Albrechts- Universität
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
Gr.	Größe
h	Stunde
HCL	Wasserstoffchlorid
HE	Hämatoxylin- Eosin
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KO	Knock-out
kV	Kilovolt
mAs	Milli-Ampère-Sekunde
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
ml	Milliliter
μ	mikro

$\mu\text{A}$	Mikroamper
N	Newton
NaCl	Natrium Chlorid
Nrf	Nuclear factor- E2 P25- related factor
s	Sekunde
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SH	Schwefelwasserstoff
TV	total volume
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig- Holstein
WT	Wildtyp

## **1 Einleitung**

### 1.1 Fraktur und Frakturheilung

Knochenbrüche sind häufige Verletzungen und ihre Behandlung stellt einen wichtigen Teil der Unfall- und orthopädischen Chirurgie dar.

Es werden verschiedene Arten von Frakturen unterschieden.

- Die traumatische Fraktur wird durch äußere Gewalteinwirkung ausgelöst. Durch Biegungs- und Schubkräfte, die die Elastizitätsgrenze des Knochens überschreiten, kommt es zum Knochenbruch.
- Die Ermüdungsfraktur ist bedingt durch eine chronische mechanische Überlastung, ein Beispiel hierfür ist die Marschfraktur der Mittelfußknochen.
- Bei der pathologischen Fraktur handelt es sich um die Fraktur eines pathologisch veränderten Knochens bei normaler Belastung oder geringer äußerer Gewalteinwirkung. Pathologische Veränderungen können Knochenmetastasen und osteoporotisch veränderte Knochen sein.

Als Folgen von Frakturen resultieren häufig eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit, eine Immobilisation, eine geringere Belastbarkeit und folglich eine Minderung der Lebensqualität. Darüber hinaus können sozioökonomische Aspekte hinzukommen, da auch die Arbeitsfähigkeit beeinträchtigt sein kann.

Durch die Frakturheilung versucht der Körper die mechanische Stabilität des Knochens wieder herzustellen. Die Frakturheilung ist ein sequentieller Prozess, der nach Knochenverletzung auftritt und vermutlich den Vorgang der embryonalen Chondro- und Osteogenese rekapituliert. Betrachtet man den Bereich nahe des Frakturspalts, lässt sich der ungestörte Heilungsprozess in fünf ineinander übergehende Phasen einteilen (29,30,31):

- die erste Phase mit dem Stadium von Hämatom und Inflammation
- die zweite Phase mit dem Stadium der Angiogenese und Knorpelbildung
- die dritte Phase mit der Knorpelkalzifikation
- die vierte Phase mit dem Knorpelabbau und der Knochenbildung
- die fünfte und abschließende Phase mit dem Remodeling

Die Phasen der Frakturheilung sind dabei nicht als isolierte, chronologisch aufeinanderfolgende Prozesse, sondern vielmehr als flüssig ineinander übergehende Abläufe zu verstehen (31).



## 1.2 Molekularbiologie der Frakturheilung

Die Art der Frakturheilung ist abhängig von der Stellung der Frakturrenden und der Stabilität der Fraktur. Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Frakturheilung (25,26).

Primäre Frakturheilung:

- Bei optimal adaptierten und stabilisierten Frakturrenden entsteht keine Kallusbildung. Hier werden zwei Formen unterschieden (27):

- Die Spaltheilung ist durch einen schmalen Spalt gekennzeichnet, der innerhalb von drei bis vier Wochen durch Granulationsgewebe überbrückt wird. Die Spaltbreite beträgt 30 bis 500  $\mu\text{m}$  (25). Fibroblasten wandeln sich zu Osteoblasten um und bilden Faserknochen, der sekundär zu Lamellenknochen umgebaut wird.

- Die Kontaktheilung erfolgt bei direktem Kontakt zwischen den Frakturrenden. Dabei schieben sich Osteoklasten aus eröffneten Havers- Kanälen in die gegenüberliegende Bruchfläche vor. Die nachfolgenden Osteoblasten mit begleitendem lockerem Bindegewebe und einer zentralen Kapillare tapezieren den Resorptionskanal mit Osteoid aus, sodass die Stabilität wieder hergestellt ist, es entsteht kein Geflechtknochen (28). Diese Situation liegt bei der operativen Osteosynthese vor, bei der z.B. durch Metallplatten die Frakturrenden dynamisch aufeinander gepresst werden (19).

Sekundäre Frakturheilung:

- Sind die Frakturrenden durch einen breiten Spalt getrennt oder durch Bewegung instabil, erfolgt die Frakturheilung über mehrere Schritte. Zunächst entsteht ein Frakturhämatom im Frakturspalt und im angrenzenden Weichteilgewebe, welches innerhalb von ein bis zwei Wochen durch ein Granulationsgewebe organisiert wird, dem bindegewebigem Kallus. Im Bereich der frakturierten Enden wird der Knochen nekrotisch und wird resorbiert. Wenn die mechanischen Verhältnisse im Knochen stabil sind, folgt die Knochenkallusbildung. Dieser Knorpelkallus wird innerhalb von vier bis sechs Wochen knöchern umgewandelt. Durch fortwährenden Knochenumbau entsteht schließlich entlang der Belastungslinien der endgültige lamelläre Knochen (20).

Die Mechanismen der Knochenheilung dürfen nicht allein als lokale Vorgänge betrachtet werden, sondern müssen als komplexes Geschehen der Skelettbiologie gesehen werden. Sie bestehen in einer Interaktion von Hormonen, Zytokinen, extrazellulärer Matrix und verschiedenen Wachstumsfaktoren (21,22).

### 1.3 Komplikationen der Frakturheilung

Während des Prozesses der Frakturheilung kann es zu mehreren Komplikationen kommen:

- Allgegenwärtig in der Medizin ist das Problem der Infektion, daher stellt diese auch die wichtigste Komplikation der offenen und osteosynthetisch versorgten Frakturen dar.
- Knochennekrosen entstehen, wenn im Frakturbereich eine Zirkulationsstörung vorliegt, ein Beispiel hierfür ist die Femurkopfnekrose nach einer Schenkelhalsfraktur.
- Bei starker Beweglichkeit der Fraktarenden, ungenügender knöcherner Konsolidierung oder zu früher Belastung, kommt es zur Bildung von faserreichem Bindegewebe, welches nicht in Kallus umgewandelt werden kann. Es entsteht ein Falschgelenk mit entsprechender Beweglichkeit, die Pseudarthrose.

In der klinischen Praxis wird zwischen verzögerter und ausbleibender Frakturheilung unterschieden. Definitionsgemäß liegt für die Heilung der langen Röhrenknochen eine verzögerte Heilung vor, wenn nach drei Monaten noch keine stabile Konsolidierung erfolgt ist. Eine Pseudarthrose liegt vor, wenn diese auch nach sechs Monaten noch nicht erfolgt ist. Pseudarthrosen spielen im klinischen, orthopädischen und unfallchirurgischen Alltag eine bedeutende Rolle, da sie direkt mit erhöhtem Versorgungsaufwand und chronischen Krankheitsverläufen verbunden sind.

In den letzten Jahren zeigt sich ein rapider Fortschritt auf dem Gebiet des molekularen Verständnisses der Frakturheilung, was sicherlich zu neuen Therapien und Versorgungsformen führen wird.

### 1.4 Frakturheilung in der Literatur

Das Interesse auf dem Gebiet der Frakturheilung ist durch die bereits genannten medizinischen und sozioökonomischen Aspekte sehr groß, daher findet man in der Literatur verschiedene Ansätze zu diesem Thema.

In diesem Zusammenhang wurden zahlreiche Frakturmodelle an verschiedenen Säugetier- und Vogelarten entwickelt. In Abhängigkeit von der Fragestellung der jeweiligen Studie wurden Spezies unterschiedlichster Größe und Anatomie von Kleinnagetieren wie der Maus (64) bis hin zu Großtiersäugern wie etwa dem Schaf (65) als Versuchstiere gewählt.

Aufgrund der geringen Kosten für Beschaffung, Zucht und Haltung der Maus sind große Versuchsgruppen bei dieser Spezies gut realisierbar. Das Genom der Maus ist in seiner Gesamtheit entschlüsselt, was einen enormen Vorteil in der Durchführung molekularbiologischer Studien darstellt. Folglich existiert für keine andere Spezies ein derart großes Spektrum verfügbarer transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper (66).

In den bis dato publizierten Frakturmodellen der Maus wurde die Knochenbruchheilung vor allem an der Rippe, der Tibia sowie dem Femur untersucht (1-3).

Frakturmodelle an Rippen eignen sich aufgrund der ungünstigen Anatomie nicht für biomechanische Testmethoden und wurden daher fast ausschließlich für Genexpressionsanalysen während der Frakturheilung herangezogen (3-6).

Im Gegensatz zur Rippe eignen sich die Tibia sowie das Femur gut für biomechanische Testungen (7-11). Grundsätzlich wird bei Tibia- und Femurfrakturmodellen an Mäusen und Ratten zwischen geschlossener und offener Frakturierung unterschieden. Für die offene Femurfrakturierung wird meist ein lateraler longitudinaler Zugang gewählt, um den Knochen unter Sicht zu frakturieren oder zu osteotomieren (67). Durch die von Cheung und Kollegen (67) beschriebene Osteosynthese mittels Fixateur externe wird eine suffiziente Stabilität im Frakturspalt erzielt. Die Nachteile dieses Modells liegen in einem hohen Implantatgewicht mit konsekutiver Behinderung des physiologischen Bewegungsablaufes der Maus, sowie in einer schwierigen Operationstechnik. Da die Fixateurpins offen eingebracht werden müssen, besitzt dieses Verfahren eine höhere Invasivität als die Marknagelung.

Die geschlossenen Frakturmodelle lassen sich im Wesentlichen auf das von Bonnarens und Einhorn an der Ratte beschriebene Guillotine-Modell zurückführen (21), welches in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde.

In den meisten Frakturmodellen an Maus und Ratte werden Femur bzw. Tibia nach definierten Zeitabschnitten explantiert und die Knochenbruchheilung mit radiologischen, biomechanischen und histologischen Methoden analysiert. In dieser Studie wurden die Experimente mit den Femurknochen durchgeführt, da die anatomischen Vorteile des Mäusefemurs gegenüber der Tibia in einem einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung (67) liegen.

Neben den Tests zur Biomechanik und Genexpression eignet sich die Maus auch zur Untersuchung von neuen Therapiemöglichkeiten. Die Arbeitsgruppe um Lee (23) beschäftigt sich mit der Gentherapie. In dieser Studie wurden menschliche Skelettmuskelzellen isoliert und mit Adeno- und Retroviren behandelt, sodass sie später in der Lage waren das Protein „bone morphogenetic protein 2“ (BMP-2) zu exprimieren. Die so behandelten Zellen wurden in nicht heilende Knochendefekte von Severe Combined Immunodeficiency (SCID)- Mäusen implantiert und nach vier und acht Wochen mikroskopisch und histologisch bewertet. Mäuse mit den behandelten Genen zeigten im Gegensatz zu den nicht behandelten Mäusen einen verheilten Knochendefekt.

Der oben aufgeführte Auszug aus verschiedenen Studien soll einen Einblick in die Vielfältigkeit der zum Thema Frakturheilung durchgeführten Arbeiten geben. Jede dieser

Arbeiten mit den zugrunde gelegten verschiedenen Modellen stellt für sich einen interessanten Ansatz dar und liefert gleichzeitig wichtige Grundlagen für eine mögliche zukünftige klinische Anwendung.

### 1.5 Nrf2 und seine Wirkung im menschlichen Organismus

Der Nuclear factor- E2 p25- related factor 2 (Nrf2; auch NFE2L2: nuclear factor erythroid-derived 2-like) gehört zur Familie der basischen Leucizippertranskriptionsfaktoren. Bei der Induktion der Transkription von Genen, die für antioxidative Enzyme kodieren, nimmt der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine Schlüsselrolle ein, da Nrf2 zu einer starken Aktivierung des „antioxidant response element“ (ARE)- Promotors dieser Gene führt. Nrf2 wird bei Fehlen eines Stimulus im Zytosol von einem cysteinreichen Protein, dem Keap1 fixiert (50). Keap1 wird durch Interaktion mit den Aktinfilamenten des Zytoskelettes in der Zelle verankert (55). Die Mechanismen, durch die das Nrf2/Keap1-System die Genexpression beeinflusst, sind umfassend untersucht worden. Durch ein stimulierendes Agens werden essentielle SH-Gruppen am Keap1 modifiziert. Die Modifikation der SH-Gruppen des Keap1 und die Freisetzung von Nrf2 erfolgt durch elektrophile, chemisch sehr unterschiedliche Substanzen. Diese Substanzen gehören zu verschiedenen Substanzklassen; zu Dithiolthionen, Isothiocyanaten, oxidierbare Diphenolen und Chinonen, Hydroperoxiden sowie Carotenoiden, vicinale Dithiolen, divalente Schwermetallkationen, trivalente Arsenverbindungen und konjugierten Polyenen. Dies hat eine Auflösung des Nrf2/Keap1-Komplexes zur Folge. Daraufhin erfolgt die Translokation von Nrf2 in den Zellkern und die Bildung von Heterodimeren mit anderen basischen Leucizipperproteinen (z.B. mit Maf-Proteinen). Durch Bindung an die ARE- Sequenz wird dann die Transkription des entsprechenden Genes induziert (52).

Über das ARE wird sowohl die basale als auch die induzierte Expression dieser Gene reguliert. Der Nrf2-Faktor bindet spezifisch an die ARE- Sequenz (49). Ein Großteil der Nrf2-Zielgene, die bislang identifiziert worden sind, kodieren für Proteine, die antioxidative Eigenschaften besitzen. Mit Hilfe von Nrf2-Knock-out-Mäusen konnte die Bedeutung von Nrf2 für die Expression jener Gene gezeigt werden. Die Nrf2-Knock-out-Mäuse exprimieren diese Gene auf deutlich niedrigerem Niveau und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber kanzerogenen Substanzen (18, 51, 53).

Microarrayanalysen von Nrf2-Knock-out-Mäusen haben z.B. gezeigt, dass die mRNA einer Glutathionperoxidase vermindert exprimiert wird. Die Glutathionperoxidase mRNA war in Nrf2-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit induzierter Lungenfibrose vermindert (48). Diese Untersuchungen zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 für die

Induktion der zelleigenen Abwehr gegen oxidativen Stress eine Rolle spielt (53). Sowohl seine antirheumatische als auch antiinflammatorische Wirkung ist beschrieben worden (54). In der Literatur gibt es zudem viele Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 auch an der Regulation von Chondrogenese und Osteogenese beteiligt ist (12,13). Damit könnte dieser Transkriptionsfaktor einen Kernpunkt der Knochenheilung darstellen. Es liegt nahe, dass er die Struktur und damit die Stabilität und die Organisation der Knochen- und Knorpelmatrices im Verlauf der Knochenreparatur beeinflusst. Grund zur Annahme, dass Nrf2 an der Frakturheilung beteiligt sein könnte, stellt auch die Konfrontation des Gewebes mit Sauerstoffspezies im Rahmen der Reperfusion und Revaskularisierung nach Fraktur dar. Übersteigt die Konzentration freier Radikale die antioxidative Kapazität des Organismus, kommt es zu oxidativem Stress. Wichtige Zellstrukturen werden dabei zerstört. Besonders bei entzündlichen Prozessen, aber auch bei Reperfusion- und Revaskularisierungsereignissen kommt es zu einem massiven Anstieg freier Radikale. So gilt es als gesichert, dass die Zerstörung, die durch chronische Entzündungen hervorgerufen wird, zum größten Teil durch oxidativen Stress verursacht wird (16). Weiterhin ist oxidativer Stress ein wichtiger Signalmechanismus, der einen inflammatorisch- proliferativen Stimulus für die Synovialozyten, Fibroblasten und Chondrozyten darstellt (16,17). Die freien Radikale dafür stammen vermutlich aus Granulozyten. Die gesteigerte Abwehr des Gewebes durch die vermehrte Expression von Phase-II-Enzymen, die protektiv gegen oxidativen Stress wirken, wirkt den Gewebsschäden entgegen.

In Abbildung 1 sind einige der bekannten Aufgaben des Nrf2- Gens dargestellt (58).

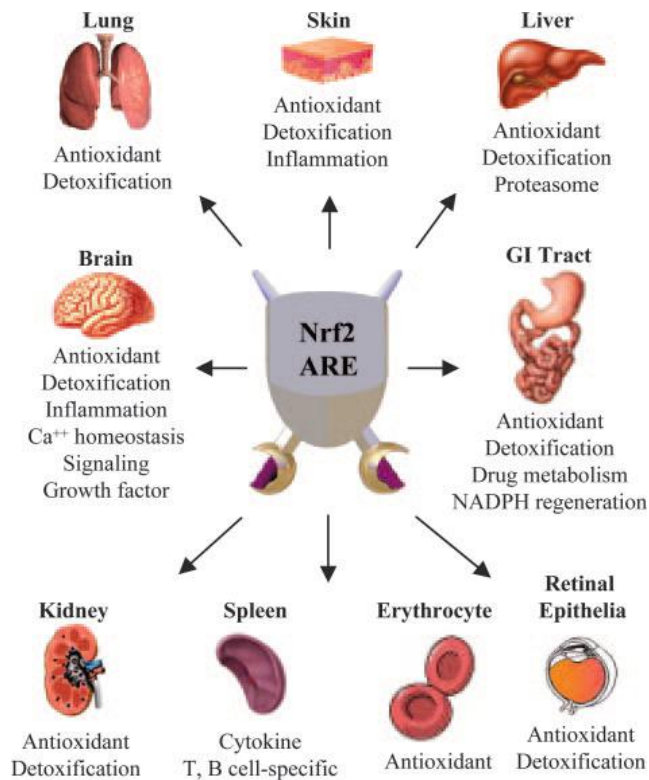


Abbildung 1: Einige Funktionen des Nrf2 Gens im menschlichen Organismus

Die antioxidative Wirkung des Gens lässt ihm in zahlreichen Organen eine wichtige Rolle zukommen (aus 58).

## 1.6 Studienziel

An standardisierten Knochenbrüchen des Femur soll im transgenen Mausmodell überprüft werden, ob durch Inaktivierung von Nrf2 für Knochen und Knorpelmatrix die morphologischen und molekularen Merkmale einer veränderten Knochenbruchheilung beobachtet werden können. Diese Veränderungen sollen neue Aufschlüsse über die direkte und indirekte Rolle von Nrf2 bei der Chondro- und Osteogenese während der Frakturheilung, sowie bei der Biogenese von Knorpelmatrix ergeben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuchsgenehmigung

Vor Beginn der Untersuchung wurde ein Antrag zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren beim Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein gestellt. Der Antrag beinhaltete die Durchführung der Untersuchung bei Wildtyp-Mäusen und genetisch veränderten Knock-out-Mäusen. Alle Versuche dieser Arbeit erfolgten unter der Aufsicht des Versuchsleiters.

Die Experimente dieser Arbeit sind von der Ethikkommission genehmigt und bestätigt worden. Die Genehmigungsnummer lautet: V312-72241.121-9 (43-4/07).

## 2.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden nach deren Genotyp in zwei Gruppen aufgeteilt. Jeder Gruppe wurden sechzehn Tiere, zwischen zehn und vierzehn Wochen alt, zugeordnet. Das Geschlecht wurde nach dem Zufallsprinzip aufgeteilt. Alle Versuchstiere wurden unabhängig vom Geschlecht und von dem Genotyp der völlig identischen operativen und postoperativen Behandlung und Haltung ausgesetzt. Die Tiere wurden in einem Käfig gehalten mit 12:12 Stunden Licht- und Dunkelheitsverhältnis. Sie wurden mit Standardfutter gefüttert und bekamen Leitungswasser ad libidum zu trinken.

## 2.3 Versuchsdauer

Um eine optimale Versuchsanordnung gewährleisten zu können, wurde die Versuchsdauer entsprechend der physiologischen Frakturheilungsdauer der Maus festgelegt. Diese liegt bei 20 Tagen (24). Um die Kallusgröße vor und nach der endgültigen Knochenheilung untersuchen zu können, wurden die Versuchstiere in Untergruppen eingeteilt. Der Zeitpunkt der Euthanasie wurde auf 14 und 28 Tage festgelegt.

## 2.4 Versuchstiere

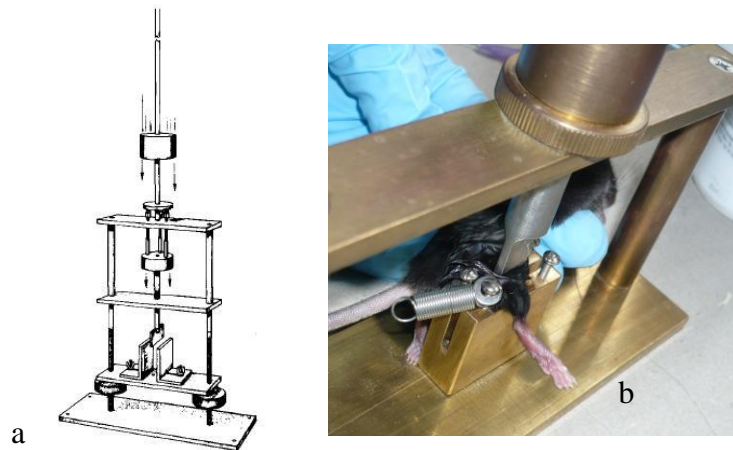
Bei den in der Studie eingesetzten Tieren handelte es sich eigens für Forschungszwecke gezüchtete Tiere. Die Tiere wurden von Prof. Dr. Yuet Way Kan (Stanford University, USA) gezüchtet. Es handelte sich um einen Knock-out (KO) des Nrf2. (ILAR- Bezeichnung 129svj- Nrf2). Die Wildtyp-(WT)-Kontrolltiere waren Wurfgeschwister der Knock-out-Mäuse.

## 2.5 Frakturmodell

Zur Erzeugung einer standardisierten Oberschenkelchaftquerfraktur wurde eine Apparatur nach Bonnarens und Einhorn (21) mit einem eigens angefertigten Guillotinmodell erzeugt (Abb.2). Durch die 3-Punkt-Biegebelastung konnte eine reproduzierbare Fraktur erzeugt werden.

Zunächst wurde eine intramedulläre Schienung mit einem 0,8 mm Draht vorgenommen. Dazu erfolgte eine parapatellare Inzision und Bohrung in die Markhöhle des Femurs (56). Nach dem Wundverschluss wurde das rechte Bein des in Rückenlage liegenden Tieres unter der Guillotine positioniert. Der Oberschenkel wurde durch den Operateur und einen Stempel in

Position gehalten, während ein Fallgewicht auf den spitz zulaufende Stempel stürzte und dessen Kraft auf die Femurvorderkante übertrug. Durch das Fallgewicht der Masse von 300 g aus einer Höhe von 6 cm wurde hierbei das Femur quer frakturiert.



*Abbildung 2: In Abbildung a ist schematisch das Modell nach Bonnarens gezeichnet. Ein Gewicht fällt auf den Stempel und übermittelt die Kraft weiter. In b sieht man ein Versuchstier nach vollendeter Operation. Das Bein ist unter dem Stempel und mittels Fingers des Untersuchers befestigt.*

## 2.6 Versuchsablauf

Die Tiere wurden während der Zeit des Eingriffes narkotisiert. Den Mäusen wurde eine Dreifach-Narkose intraperitoneal injiziert, sie bestand aus Fentanyl 0,05 mg/kg, Midazolam 5mg/kg und Medetomidin 0,5 mg/kg. Nach fünf Minuten waren die Tiere tief sediert und die Anästhesie hielt für ca. 20 Minuten an.

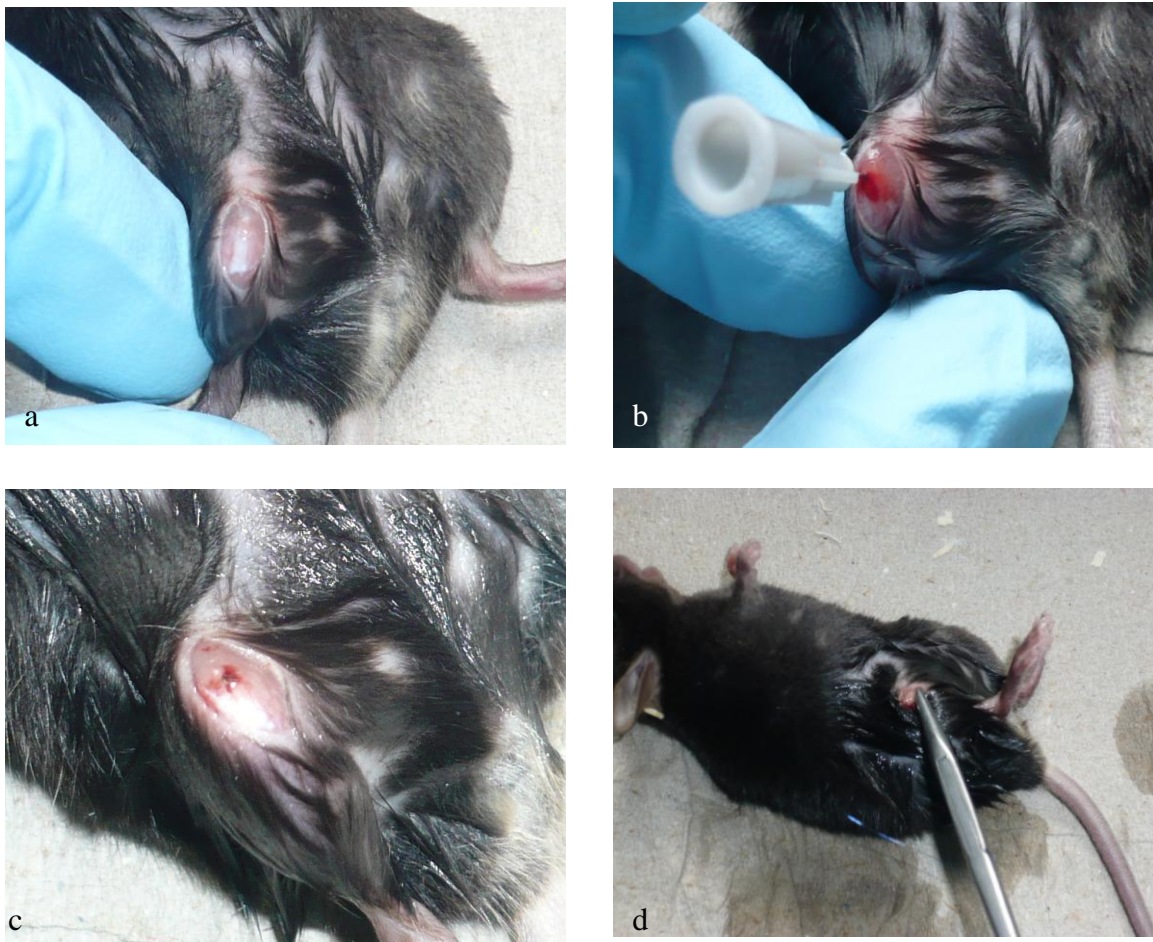
Zu Beginn der Operation wurde ein Stück der Schwanzspitze asserviert und für die Genotypisierung eingefroren. Die Genotypisierung diente zur Verifizierung der Genotypen. Nach ausreichender Narkosetiefe wurde die zu operierende Maus in Rückenlage gelagert und das rechte Bein mit Desinfektionsmittel „Kodan“ für den Eingriff vorbereitet. Eine 0,3 cm laterale Inzision auf Kniehöhe erlaubte die Sicht auf die Patella, die Sehne des M. quadriceps, die Andeutung der Femurkondylen, und die Kniegelenkscapsel (Abb.1a).

Zunächst erfolgte die Luxation der Patella und die Eröffnung des Markraums in der interkondylären Grube. In den Markraum wurde mittels einer Kanüle eine Eröffnung gebohrt, durch den eine größere Kanüle platziert wurde. Abbildung 1b zeigt den Zustand nach Öffnen des Markraums und Platzieren der Kanüle. Überstehender Draht wurde über den Kondylen abgesetzt (Abb.3c). Um den Draht in Position zu halten wurde eine Kanülenspitze in den eröffneten Markraum eingefügt. (Abb.4a). Abschließend wurde die Patella reponiert und der



Zugang in zwei Schichten mit 6-0 resorbierbarem Faden verschlossen (Abb.3d). Unter andauernder Narkose wurde nach dem Modell von Bonarens eine geschlossene Fraktur im mittleren Schaftdrittel erzeugt (15) (Abb.2).

Die Operationszeit betrug fünf bis zehn Minuten. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte mit Naloxon 1,2 mg/kg, Flumazenil 0,5 mg/kg und Atipamezol 2,5 mg/kg. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Metamizol 50-100 mg/kg im Trinkwasser ad libidum. Die Versuche wurden gemäß dem Standard der GLP (Good Laboratory Practice) durchgeführt. Die Euthanasie erfolgte durch letale Kohlenstoffdioxidgabe. Es wurden sowohl das rechte, als auch das linke Femur exartikuliert, von Weichteilgewebe befreit und in Formalin asserviert.



*Abbildung 3: Dargestellt ist der Operationsverlauf bei einer sedierten Maus. Nach der Desinfektion des Knies erfolgt die Inzision auf Kniehöhe (a). Die Patella ist zu sehen. Nach Bohrung in die Markhöhle wird der Draht in den Markraum platziert (b) und überschüssiger Draht wird gekürzt (c). Die Inzision wird mittels zweischichtigen Wundverschluss genäht (d).*

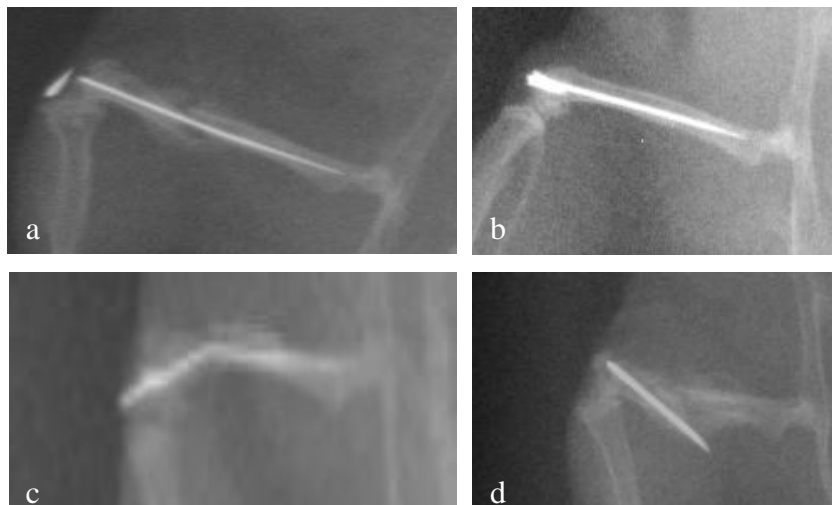
## 2.7 Bildgebung

Die Bildgebung wurde in Kooperation mit der Radiologie des UKSH, Campus Kiel, der Unfallchirurgie und der experimentellen Radiologie (Prof. Dr. Martin Heller und Prof. Dr. rer. nat. CC Glüer) durchgeführt.

### 2.7.1 Röntgen

Zur Begutachtung der Brüche und der Lokalisation der Markraumschiene wurden Röntgenbilder mit 50 kV und 2 mAs aufgenommen (Abb.4).

Das Röntgen ist in der Medizin weit verbreitet, um Anomalien im Skelettsystem darzustellen. Dazu werden Röntgenstrahlen unterschiedlicher Stärken benutzt, um unterschiedliche Bereiche des Körpers darzustellen. So nutzt man z.B. 25- 30 kV bei der Mammographie und etwa 38 bis 120 kV bei den üblichen Körperregionen. Je weicher die Strahlung (niedrige kV-Werte) ist, desto mehr wird von den umgebenden Geweben absorbiert, dadurch können kleinste Unterschiede im Gewebe dargestellt werden. Diese Eigenschaften ermöglichen es, im Röntgen den Frakturspalt darzustellen und Kallusgewebe von mineralisiertem Knochen zu unterscheiden.



*Abbildung 4: Die abgebildeten Röntgenbilder zeigen verschiedene Ergebnisse der Operation. a) Die Fraktur ist in Schaftmitte und der Draht im Markraum platziert, lediglich die Kanülenspitze ist disloziert. b) Kanüle und Kanülenspitze sind im Mark platziert, das Femur ist nicht frakturiert. c) Der Draht ist gebogen und die Fraktur zu proximal. d) Trümmerfraktur mit disloziertem Draht.*

### 2.7.2 Mikro-CT

In Kooperation mit der Klinik für diagnostische Radiologie des UKSH in Kiel, (Direktor Prof. Dr. Heller, und Prof. Dr. rer. nat. CC. Glüer) wurden die computertomographischen Untersuchungen durchgeführt. Die in 70% Ethanol asservierten Femora wurden vor der Fixierung und nachfolgendem Einfrieren mit dem Computertomographen XCT FAN Beam  $\mu$ -Scope untersucht. Dabei wurden Kallusdurchmesser und trabekuläre Struktur digital dokumentiert. Dieser Scanner ermöglicht eine ultrahohe Auflösung für in vitro Messungen zur dreidimensionalen Darstellung der Trabekularstruktur und Histomorphometrie. Anders als in einem gewöhnlichen CT sind Röntgenröhre und Detektor fixiert und die Probe rotiert.

Die Abbildung 5 zeigt das Mikro-CT der Klinik für Radiologie der UKSH.

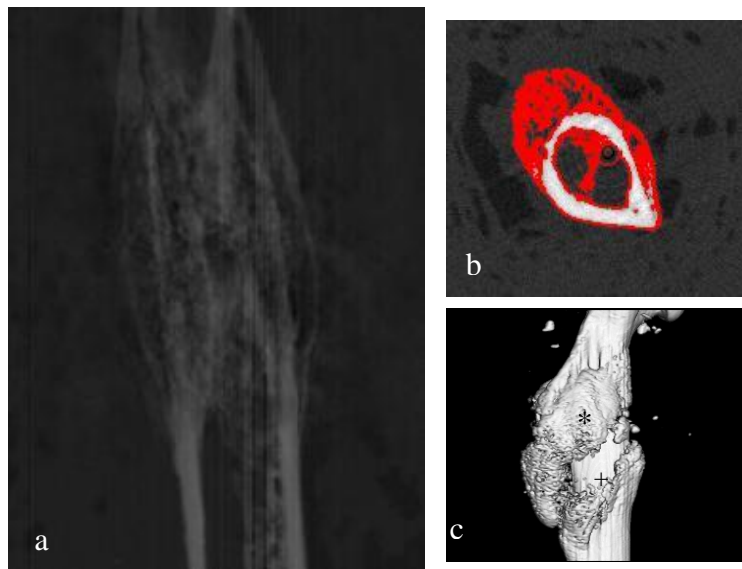


*Abbildung 5: Mikrocomputertomograph  
Der FAN Beam  $\mu$ -Scope (STRATEC Medizintechnik, Pforzheim) dient zur Mikrocomputertomographie der Femora der Mäuse (a). Im Innenbereich (b) sieht man die Röhre(\*), in der das Femur positioniert wird.*

Als Strahlenquelle diente eine Mikrofokus Röntgenröhre mit einer Spannung von 40 kV. Diese geringe Spannung resultierte aus der geringen Größe der Probe. Die Stromstärke betrug 195  $\mu$ A. Es wurde ein Röntgenfilter von 18  $\mu$ Cu verwendet. Die Knochenproben der Mäusefemora wurden in einem Plastikbehälter fixiert. Die Messzeit pro Schicht dauerte zwischen 30 und 180 Sekunden. Es wurden 200 bis 300 Schichtaufnahmen gemacht. Die gesamte Analysezeit betrug ca. 8 Stunden pro Probe. In Abbildung 6 sind einige Aufnahmen dargestellt.

Das Mikro-CT liefert Daten in Form von Voxeln. Bei einem Voxel, auch Volumenpixel genannt, handelt es sich um das dreidimensionale Äquivalent eines Pixels. Eine Voxelkantenlänge beträgt 0,033 mm, um das Volumen zu berechnen muss dieses zum Kubik genommen werden. Somit war ein Voxelvolumen 0,000035937 mm<sup>3</sup> groß. Die analysierten Bilder wurden mit der Software Image-J ([rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)) dargestellt. Der Bereich des

Interesses (volume of interest VOI) wurde im Bereich des Kallus festgelegt. Die Voxel mit einer Hounsfield-Einheit größer als 400 wurden als Knochenvoxel erkannt. In dem Bereich des VOI wurden die Knochenvoxel in Relation zum totalen Voxelvolumen ausgewertet (BV/TV).



*Abbildung 6: Dargestellt sind mikrocomputertomographische Bilder eines Kallus. In a ist eine sagittale Aufnahme zu erkennen. Das Kallusgewebe ist durch das aufgelockerte Signal erkennbar. In b ist der Kallus farblich (rot) vom restlichen Knochengewebe abgehoben. Eine dreidimensionale Aufnahme des Knochenkallus(\*) und des dazugehörigen Frakturspalts (+) ist in Abbildung c sichtbar.*

### 2.7.3 DXA-Scan

Die DXA- (Dual Energy X-Ray Absorbtiometry) Messung wird zur Osteoporosedagnostik genutzt. Mit dieser Methode ist es möglich die Dichte einzelner Körperteile zu berechnen. Sie wird zur Knochendichtemessung verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Früherkennung des qualitativ noch normalen, quantitativ aber bereits osteoporotisch veränderten Knochens. Das Gerät, welches uns zur Verfügung gestellt wurde, heißt DXA Scan Hologic (GE LUNAR) (Abb.7).

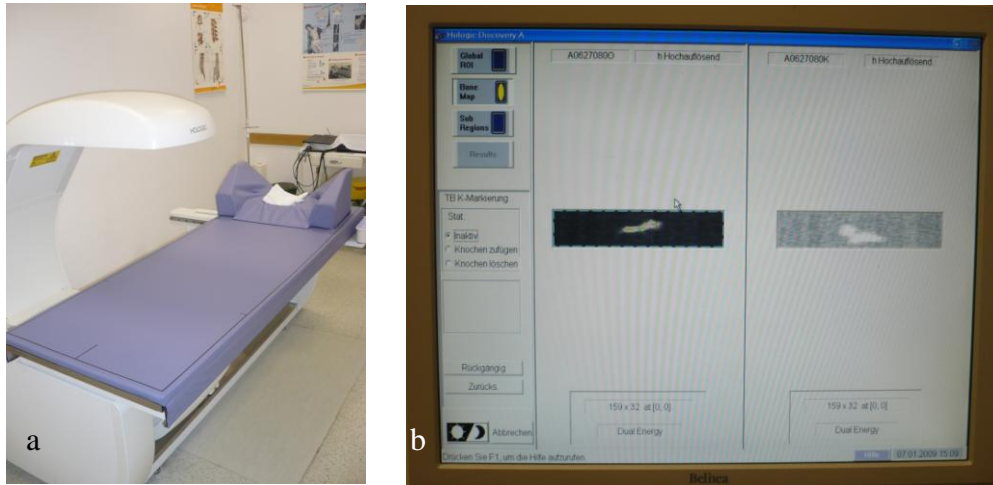


Abbildung 7: Der DXA-Scan Hologic (a) dient zur Knochendichtemessung bei osteoporotisch veränderten Knochen. Mit Hilfe des Programms Hologic Discovery kann der Knochen eingegrenzt (b) und der Knochenmineralgehalt, Knochendichte und die Knochenfläche bestimmt werden.

Das Prinzip der DXA-Messung basiert methodisch auf der Messung der Strahlentransmission von zwei separaten Photonen-Energien (38KeV und 70 KeV) durch ein Medium, welches sich aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammensetzt, im Falle dieser Studie Knochen und Knorpel. Aus der gemessenen abgeschwächten Photonenflussrate beider Energieniveaus kann letztlich der Mineralgehalt des Knochens errechnet werden (LUNAR R Handbock of Operators Manual). Mit der Software „Hologic Discovery A“ (GE LUNAR) werden die gescannten Knochen untersucht und ausgewertet. Mithilfe dieses Programms können die Knochenflächen, die Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density) und der Knochenmineralgehalt (BMC=bone mineral content) bestimmt werden.

Die Sensitivität der Analyse bezüglich der Darstellung von Unterschieden in der Knochenmasse war auf Grund der geringen Größe der Mausfemora sehr klein. Um eine bessere Darstellung zu erreichen, musste eine manuelle Eingrenzung der Knorpel/ Knochenmasse erfolgen.

Zur DXA-Untersuchung wurden pro Gruppe fünf bzw. sechs Tiere untersucht. Die Knochen wurden einzeln mehrfach (5mal) gemessen und der Mittelwert dieser Werte für die weiteren Berechnungen verwendet.

## 2.8 Histologie

Die histologische Aufarbeitung von Geweben ist eine in der medizinischen Forschung weit verbreitete Methode. Sie ermöglicht durch die Anwendung verschiedener Färbemethoden die Beurteilung von Zellen und Gewebsbestandteilen auf mikroskopischer Ebene.

Die histologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des UKSH Campus Kiel (Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Wiltfang und Prof. Dr. med. Acil) durchgeführt.

Bei dieser Untersuchung wurden sowohl die frakturierten rechten Femora, als auch die unfrakturierten linken untersucht.

### 2.8.1 Entkalkifizierte Histologie

Ein Teil der Knochenproben wurde in 0,5 M EDTA bei pH 7,4 dekalzifiziert und anschließend in Paraffin eingebettet. Schnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden mit einem Leica Mikrotom HM 430 aus dem Frakturbereich hergestellt. Sie wurden auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Die Entparaffinierung vor der Färbung mit Toudinblau bzw. mit Hämatoxylin-Eosin lief nach folgendem Standardschema ab:

Tabelle 1: Alkoholreihe der entkalkifizierten Histologie

Dauer (min)	Medium
3 x 3	Einlegen der Proben in Xylol
3 x 3	In 100% Ethanol
2 x 3	In 90% Ethanol
2 x 3	In 80% Ethanol
1 x 3	In 70% Ethanol
1 x 3	In 50% Ethanol
2 x 3	Spülen mit Aqua dest

### 2.8.2 Kalzifizierte Histologie

Die Proben für die kalzifizierte Histologie wurden in 10 %igem gepufferten Formalin fixiert. Nach Fixierung wurden die Proben zur Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Methylmetacrylat im Einbettautomaten eingebettet.

Tabelle 2: Alkoholreihe der kalzifizierten Histologie

Dauer (h)	Medium
2	60% Ethanol
2	80% Ethanol

---

4	90% Ethanol
5	96% Ethanol
4	100% Ethanol
1	1 : 1 Aceton- Ethanol
4	1 : 1 Aceton- Ethanol
1	100% Ethanol
4	100% Ethanol
3	100% Ethanol
12	Methylmetacrylat
72-96	Einbettungsgemisch (Kühlschrank)

---

Gefahren, die bei der Entwässerung auftreten können sind Zerreißen, Schrumpfen, Härten oder Lipidextraktion der Präparate (57).

Es war unbedingt notwendig das Einbettungsgemisch sofort nach der Einbettung kühl zu lagern. Bei zu warmer Lagerung bestand die Gefahr der Auspolymerisation, was dazu geführt hätte, dass die Proben nicht mehr ausreichend hätten beurteilt werden könnten.

Das Einbettungsgemisch wurde in Glasgefäße (Weithalsflaschen) gefüllt und im Wärmebad ausgehärtet. Auf die entstandenen Sockel wurden die einzelnen Proben gelegt und mit dem Einbettungsgemisch übergossen, bis sie vollständig von diesem umgeben waren. Die Gläser wurden erneut in das Wärmebad gestellt. Nach Aushärtung des Gemisches wurden die Glasgefäße um die Blöcke zerschlagen und mit einer Tischbandsäge zugeschnitten. Die Präparatblöcke wurden nun mit einem Schleifgerät und dem dazugehörigen Silikonkarbidpapier auf Hochglanz poliert, nachdem die Probe an der Oberfläche geringfügig freigelegt wurde.

Es wurden nun Objektträger aus Kunststoff mit einer doppelseitig klebenden Folie versehen. Der Probenblock wurde mit einem schnell härtenden Kleber auf die Folie aufgebracht und mit der Präzisionsbandsäge ein circa 120 µm dicker Sägeschnitt angefertigt. Dieser wurde erneut geschliffen und poliert, so dass die Schnitte eine Dicke von 80 - 100 µm aufwiesen.

Die Folie wurde nun vom Objektträger gelöst, zurechtgeschnitten und von jedem Sägeschnitt eine Mikroradiografie angefertigt.

### 2.8.3 Mikroradiografie

Die Folien mit den aufgeklebten und auf Hochglanz polierten Sägeschnitten wurden auf speziellen Mikroradiografieplatten fixiert. Die Belichtung erfolgte mit dem Gerät Faxitron bei 3 mAs, 25 kV für 10 Minuten und einem Fokusabstand von 16 cm.

Im Anschluss an die Belichtung erfolgte die Entwicklung mittels Periomat Entwickler (1 : 9) für fünf Minuten und die Fixierung mit Kodak Fixierer (1 : 4) für zehn Minuten.

Die so hergestellten Röntgenaufnahmen der Präparate erlauben eine Beurteilung der Proben hinsichtlich der Quantität des neugebildeten Knochens sowie auch der unterschiedlichen Mineralisierungsgrade durch entsprechende Graustufungen (Abb.8 A, rechte Seite).

Danach wurden die Schnitte mit der Präparatseite auf einen Objektträger aufgeklebt und mittels blauem Licht ausgehärtet. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Toluidinblau.

### 2.8.4 Färbung mit O-Toluidinblau

Toluidinblau ist ein basischer Thiazinfarbstoff. Mit ihm lassen sich unterschiedliche Gewebe im Labor einfach und schnell färben. Die mineralisierte Hartgewebematrix bleibt ungefärbt und stellt sich blassblau dar. Zellen und Weichteilgewebe sind unterschiedlich blau, Knorpelmatrix und Mastzellengranula erscheinen metachromatisch rotviolett und die verkalkte Knorpelmatrix ist dunkelblau gefärbt.

Die Färbemethode wurde nach Romeis modifiziert durchgeführt (57).

Zum Entkalken der Schliffoberfläche und zur Verbesserung der Anfärbbarkeit der Knochenmatrix wurden die Präparate für zwei bis vier Minuten mit 0,1 %iger Ameisensäure vorbereitet und anschließend mit Aqua dest gespült. Um die Zell- und Weichgewebefärbung zu verbessern, mussten die Präparate anschließend für 60 bis 120 Minuten in 20 %iges Methanol eingelegt werden, jedoch nicht länger als 120 Minuten, da ein längeres Lagern zum Verquellen der Zellen führen konnte. Es folgte eine weitere Spülung mit Aqua dest. Daraufhin wurden die Hartschliffpräparate für drei Minuten in das filtrierte Toluidinblau eingelegt. Danach wurde eine weitere Spülung mit Aqua dest vorgenommen. Anschließend erfolgte eine Differenzierung unter dem Mikroskop mit HCl- Alkohol und Toluidinblau, um die Strukturen optimal darstellen zu können. Somit war eine bessere Beurteilung des Knochenkallus möglich.

### 2.8.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei diesem Verfahren wird mit Hämatoxylin negativ geladenes Gewebe, wie zum Beispiel die DNA des Kernchromatins oder die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, blau



gefärbt und mit Eosin positiv geladenes, azidophiles Gewebe, wie zum Beispiel Eiweiße (Zytoplasma), je nach Einwirkungsdauer, stärker oder schwächer rot gefärbt.

Zur Färbung wurden folgende Schritte durchlaufen:

Zuerst wurden die Präparate für drei Minuten in saures Hämatoxylin nach Mayer eingetaucht (59). Anschließend wurden sie zehn Minuten unter fließendes kaltes Leitungswasser gehalten, um dann für 30 Sekunden in 1 %iges Eosin eingetaucht zu werden. Es folgte ein kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol, 80 % Ethanol und schließlich 100 % Ethanol. Zuletzt wurden die Präparate mit alkohollöslichen Eindeckmitteln und Deckgläsern bestückt.

## 2.9 Statistische Auswertung

Nach erfolgter Beratung durch das Institut für medizinische Informatik und Statistik (Direktor Prof. Dr. rer. nat. Michael Krawczak) wurden die erhobenen Daten mit dem Programm R-Statistics ausgewertet. Dabei wurde der T-Test verwendet. Die Voraussetzung für diesen Test ist eine normverteilte Grundgesamtheit, wovon hier ausgegangen wurde, da alle Tiere unter denselben Bedingungen gezüchtet wurden. Die Normverteilung wird durch den Erwartungswert ( $\mu$ ) und der Varianz gekennzeichnet. Beim T-Test muss die Varianz gleich sein, was durch den Varianztest bestätigt wurde. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

## 2.10 Liste der verwendeten Materialien

### **Chemikalien**

$\alpha,\alpha$ - Azoisobutyronitril von Fluka 11630, Deutschland

Dibutylphtalat von Merck, Deutschland

Eindeckmittel von Eukitt® von Kindler, Freiburg, Deutschland

Eosin gelblich von Merck, Deutschland

Hämalaun n. Mayer von Merck, Deutschland

Methylmetacrylat von Sigma-Aldrich M5,590-9, Deutschland

Nonylphenyl- polyethyleneglycol acetat von Fluka, 74432, Deutschland

### **Geräte und Utensilien**

Computertomograph XCT FAN Beam  $\mu$ -Scope von STRATEC Medizintechnik, Pforzheim, Deutschland.

Desinfektionsmittel von Kodan tinktur forte, Schülke und Mayr GmbH, Deutschland.

Doppelseitig klebende Folie von Gudy Clear 23 Fa, USA

Drei- Punkt- Biegeappatur von der wissenschaftlichen Werkstatt UKSH Campus Kiel, Deutschland.

DXA Scan Hologic von GE LUNAR, Hologic, Norland.

Einbettautomat von Pool of Scientific Instruments, Ltd., Basel, Schweiz

Einmalskalpell von Feather No.10, Deutschland

Einnmalkanülen von Sterican Kanüle Gr.20 und Gr.12, B.Braun, Deutschland

Faden, 6-0 resorbierbar von Ethicon Inc.Sommerville, NJ, USA

Faxitron von Hewlett Packard, Ore, USA

Klebstoff von Henkel Loctite Adhesives Ltd, Watchmead, Deutschland

Leica Mikrotom HM 430 von Microtom Internationel, USA

Lichtmikroskop von Carl Zeiss GmbH, Deutschland

Mikroradiografieplatten von High Resolution Platten, Auflösungsvermögen 2000 Linien / Millimeter, Kodak, New York, USA

Paraffinblock von Medite Tissue Processor TPC 15, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland

Periomat Entwickler von Dürr Dental, Stuttgart, Deutschland

Präzisionsbandsäge von EXACT, Deutschland

Röntgengerät DR 9000 von Kodak, USA

Röntgenplattenentwickler von Kodak Systems, USA

Schleifgerät von Fa. ATA, Deutschland

Schlittenmikrotom von HM 430, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland

Technovit Präzisionskleber von Fa. Kulzer, Deutschland

Tischbandsäge von Metabo, Deutschland

Wärmebad von Köttermann GmbH & Co KG, Deutschland

### **Medikamente**

Atipamezol (Antisedan®) von Orion Corporation, Espoo, Finland

Fentanyl (Fentanyl®-Janssen) von JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss, Deutschland

Flumazenil HEXAL von Hexal Akiengesellschaft, Deutschland

Metamizol (Novalgin ®) von Sanofi-Aventis, Deutschland

Metedomidin (Domitor ®) von Pfizer vet, Deutschland

Midazolam (Dormicum ®) von Roche Pharma AG, Deutschland

Naloxon- ratiopharm von ratiopharm GmbH, Deutschland

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikro-CT

Zwei und vier Wochen nach der Fraktur hatten die KO-Mäuse ein signifikant kleineres Kallusvolumen als die WT-Mäuse (Abb. 8).

##### 3.1.1 Kallusgröße nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen

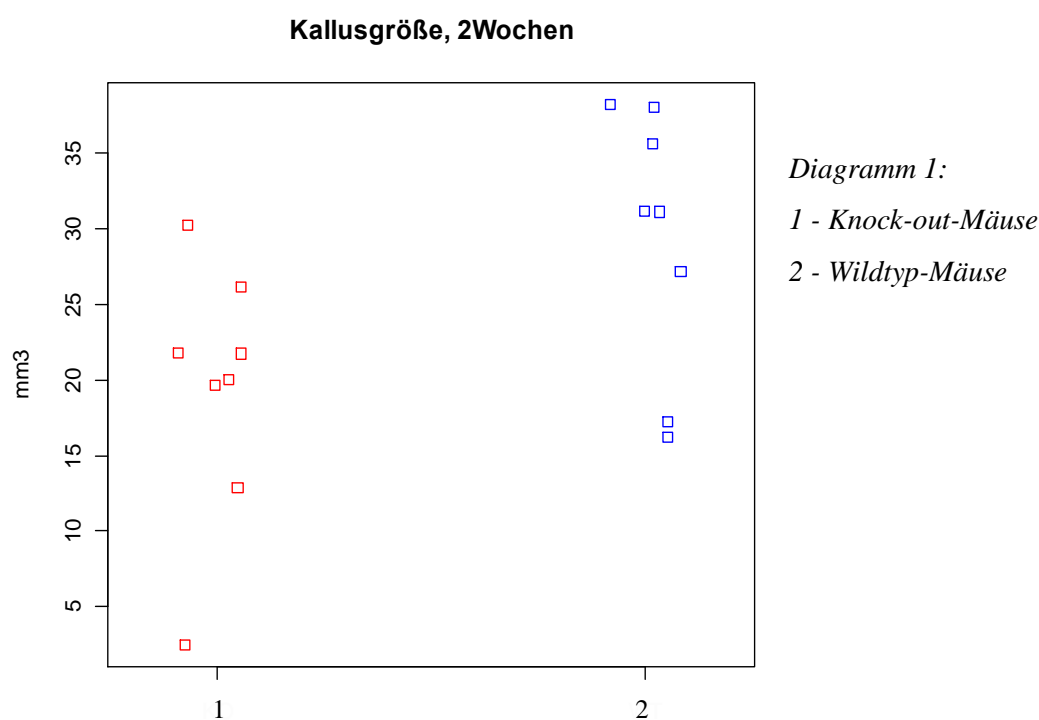
Die Untersuchungen der Kallusvolumina der Knock-out-Mäuse ( $19,38 \text{ mm}^3 \pm 8,47 \text{ mm}^3$ ) und die der Wildtyp-Mäuse ( $29,41 \text{ mm}^3 \pm 10,16 \text{ mm}^3$ ) zeigten einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Die einzelnen Daten sind in Tabelle 3 und 4 und im Diagramm 1 wiedergegeben.

Tabelle 3: Kallusvolumina Nrf2<sup>-/-</sup>, 14 Tage

Nrf2 KO <sup>-/-</sup>	Voxel	Voxelvolumen (x 0,3 <sup>3</sup> /1000)
M1	69667	2,5 mm <sup>3</sup>
M2	604828	21,74 mm <sup>3</sup>
M3	606711	21,8 mm <sup>3</sup>
M4	358471	12,89 mm <sup>3</sup>
M5	557979	20,05 mm <sup>3</sup>
M6	547306	19,67 mm <sup>3</sup>
M7	727836	26,16 mm <sup>3</sup>
M8	840967	30,22 mm <sup>3</sup>
Mittelwert	539220,625	19,38 mm <sup>3</sup>
Standardabweichung	221670,657	8,47 mm <sup>3</sup>

Tabelle 4: Kallusvolumina Nrf2+/+, 14 Tage

Nrf2 KO+/+	Voxel	Voxelvolumen (x 0,3 <sup>3</sup> /1000)
M11	480207	17,27 mm <sup>3</sup>
M12	450442	16,19 mm <sup>3</sup>
M13	991121	35,62 mm <sup>3</sup>
M14	866260	31,13 mm <sup>3</sup>
M15	1063110	38,2 mm <sup>3</sup>
M16	1059551	38,08 mm <sup>3</sup>
M17	757435	27,22 mm <sup>3</sup>
M18	868265	31,2 mm <sup>3</sup>
Mittelwert	818448,5	29,41 mm <sup>3</sup>
Standardabweichung	282817,076	10,16 mm <sup>3</sup>



### 3.1.2 Kallusgröße nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen

Die Untersuchungen der Kallusvolumina der Knock-out-Mäuse ( $14,17 \text{ mm}^3 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ ) und die der Wildtyp-Mäuse ( $26,92 \text{ mm}^3 \pm 6,46 \text{ mm}^3$ ) zeigten einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Die einzelnen Daten sind in den Tabelle 5 und 6 und im Diagramm 2 wiedergegeben.

Tabelle 5: Kallusvolumina Nrf2 KO-/-, 28 Tage

Nrf2 KO-/-	Voxel	Voxelvolumen (x 0,3 <sup>3</sup> /1000)
M21	508523	18,27 mm <sup>3</sup>
M22	424459	15,25 mm <sup>3</sup>
M23	311619	11,2 mm <sup>3</sup>
M24	460428	16,55 mm <sup>3</sup>
M25	266975	9,59 mm <sup>3</sup>
M26	316376	11,37 mm <sup>3</sup>
M27	475509	17,09 mm <sup>3</sup>
M28	499573	18 mm <sup>3</sup>
Mittelwert	394400,8	14,172 mm <sup>3</sup>
Standardabweichung	101706,838	3,655067715 mm <sup>3</sup>

Tabelle 6: Kallusvolumina Nrf2 +/+, 28 Tage

Nrf2 KO+/+	Voxel	Voxelvolumen(x0,3 <sup>3</sup> /1000)
M31	440768	15,84 mm <sup>3</sup>
M32	855349	30,78 mm <sup>3</sup>
M33	772904	27,78 mm <sup>3</sup>
M35	723677	26,01 mm <sup>3</sup>
M36	978560	35,17 mm <sup>3</sup>
M37	720338	25,89 mm <sup>3</sup>
M39	711310	25,56 mm <sup>3</sup>
M40	480816	17,29 mm <sup>3</sup>
Mittelwert	748599,333	26,9116667 mm <sup>3</sup>
Standardabweichung	179470,372	6,45533397 mm <sup>3</sup>

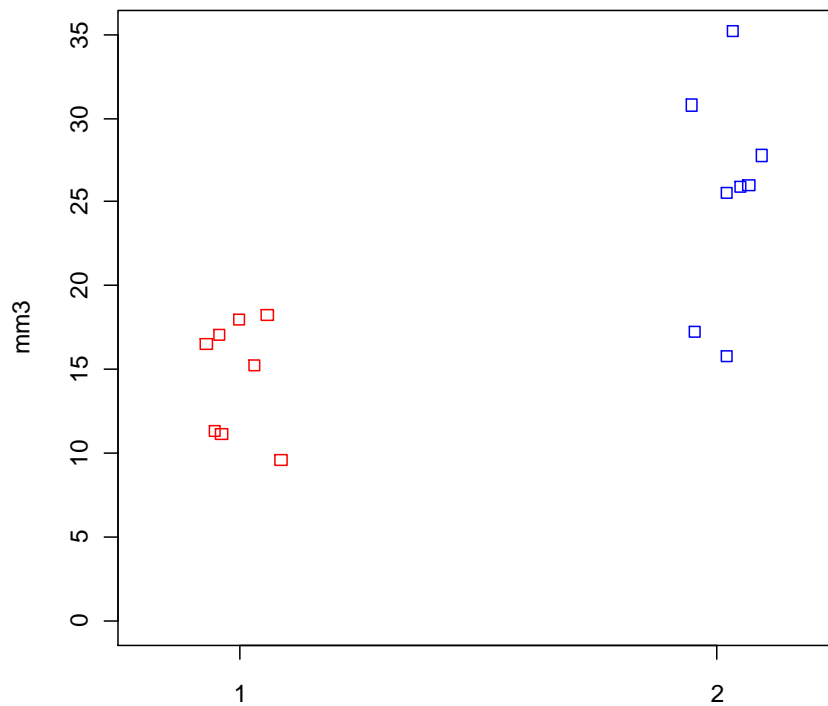
**Kallusgröße, 4 Wochen**

Diagramm 2:

1 – Knock-out-Mäuse

2 – Wildtyp-Mäuse

Die Berechnung der Parameter zur Charakterisierung des Knochens zeigten keine signifikanten Unterschiede nach zwei und vier Wochen. Sowohl das Verhältnis von Knochenvolumen zu Totalvolumen (BV/TV) als auch der Anteil des trabekulären Knochens (trabecular bone) sowie des kortikulären Knochens (cortical bone) zeigten im Verlauf der beobachteten Frakturheilung keinen signifikanten Unterschied (Abb. 8 C,D,E).

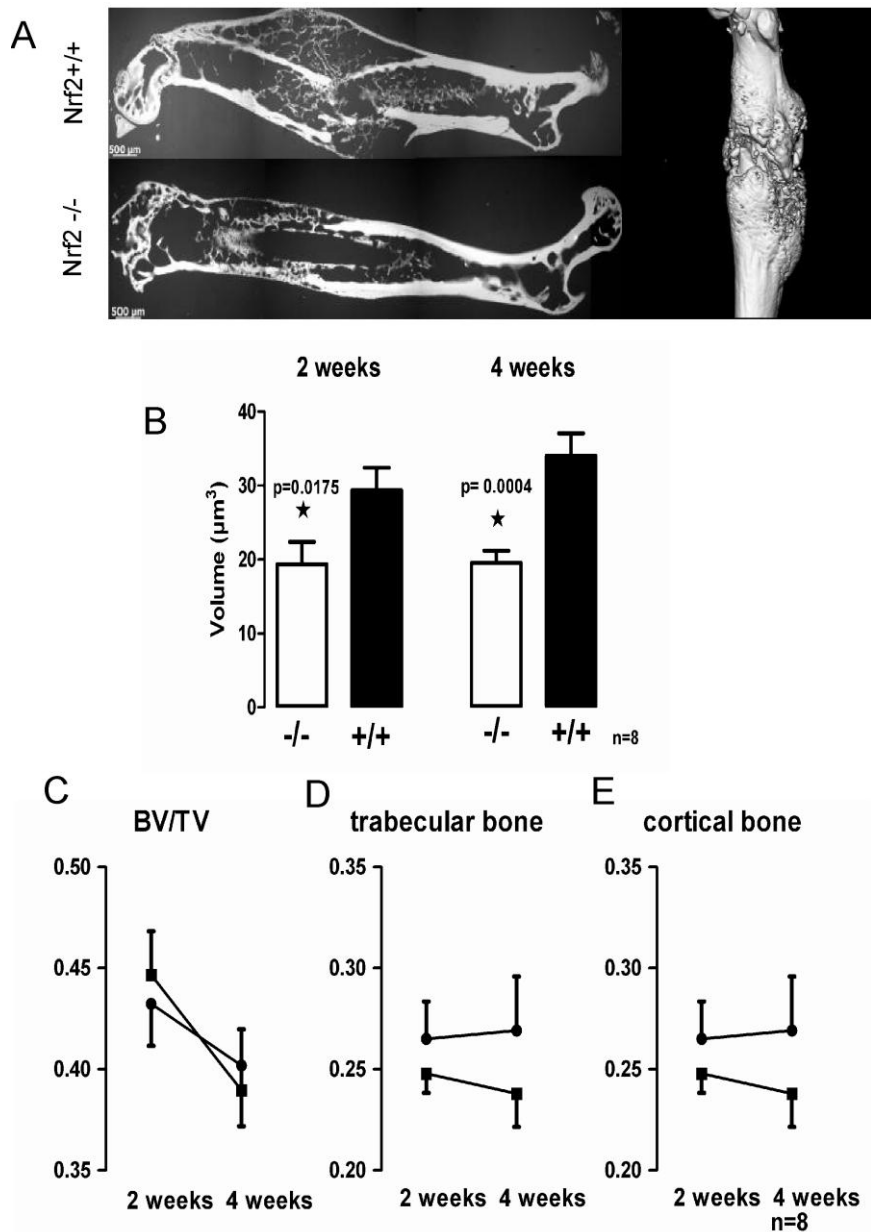


Abbildung.8:  $\mu$ CT-Messungen der frakturierten Knochen

A) Repräsentative mikroradiographische Schnitte der frakturierten Knochen von Nrf2-KO und WT-Mäusen und eine 3D Rekonstruktion von einem Nrf2-WT-Femur vier Wochen nach der Fraktur.

B) Kallusvolumina, C) Knochenvolumen/ Totalvolumen, Volumina der trabekulären Knochen (D) und der kortikalen Knochen (E) wurden zwei und vier Wochen nach der Fraktur kalkuliert.

Quadrat: Nrf2<sup>-/-</sup>

Kreis: Nrf2<sup>+/+</sup>



### 3.2 DXA- Knochenscan

Es wurden die Ergebnisse der Knochenmineraldichte, des Knochenmineralgehalts und der Fläche ausgewertet. Die nachfolgenden Diagramme zeigen die Mittelwerte der Ergebnisse.

#### 3.2.1 BMD

Die Knochenmineraldichtemessung der Nrf2<sup>-/-</sup> Mäuse ergab einen Mittelwert von 0,08 g/cm<sup>2</sup> ± 0,01. Die Messung der Knochenmineraldichte von den Wildtyp-Mäusen ergab ebenfalls 0,08 g/cm<sup>2</sup> ± 0,01, jeweils bei einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Somit konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (p > 0,05).

In der Gruppe der Knock-out-Mäuse ergab sich ein Mittelwert nach 28- tägiger Beobachtung von 0,14 g/cm<sup>2</sup> ± 0,14, in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse ein Mittelwert von 0,1 g/cm<sup>2</sup> ± 0,01. Auch diese Werte lieferten keinen signifikanten Unterschied (p >0,05). Die einzelnen Messdaten sind in den Tabellen 7 und 8 und den Diagrammen 3 und 4 gezeigt.

Tabelle 7: Knochenmineraldichtemessung nach 14-tägiger Beobachtung

Messungen	Nrf2 <sup>-/-</sup>	BMD(g/cm <sup>2</sup> )	Nrf2 <sup>+/+</sup>	BMD(g/cm <sup>2</sup> )
1	M1	0,076	M11	0,071
2	M2	0,092	M12	0,087
3	M3	0,078	M13	0,077
4	M4	0,080	M14	0,101
5	M5	0,080	M15	0,084
	Mittelwert	0,081	Mittelwert	0,084
	Standardabweichung	0,006	Standardabweichung	0,011

Diagramm 3:

**BMD- Messung nach 14- tägiger  
Beobachtung**

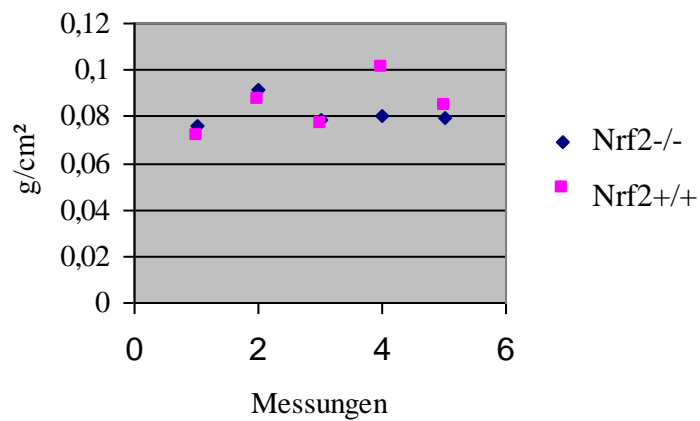
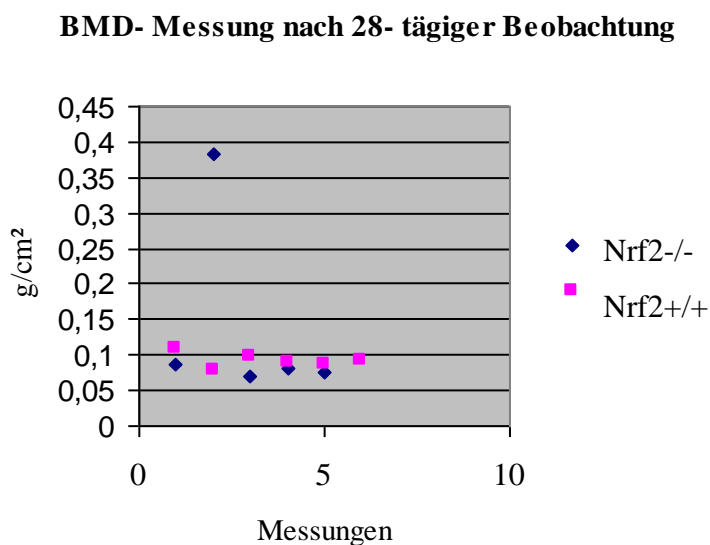


Tabelle 8: Knochenmineraldichtemessung nach 28- tägiger Beobachtung

Messung	Nrf2-/-	BMD (g/cm²)	Nrf2+/+	BMD(g /cm²)
1	M21	0,088	M31	0,109
2	M22	0,383	M32	0,079
3	M23	0,069	M33	0,097
4	M24	0,082	M34	0,089
5	M25	0,074	M35	0,086
6			M36	0,093
	Mittelwert	0,139	Mittelwert	0,092
	Standardabweichung	0,136	Standardabweichung	0,010

Diagramm 4:



### 3.2.2 BMC

Der Knochenmineralgehalt betrug bei den Knock-out-Mäusen  $0,03 \text{ g} \pm 0,004$  nach 14 Tagen, und  $0,04 \text{ g} \pm 0,03$  nach 28 Tagen Beobachtung. Der Mineralgehalt der Wildtyp-Mäuse betrug  $0,03 \text{ g} \pm 0,01$  nach 14- tägiger und  $0,04 \text{ g} \pm 0,01$  nach 28- tägiger Beobachtung. Der Vergleich der Werte zwischen den Gruppen zeigte kein signifikantes Ergebnis ( $p > 0,05$ ).

Die einzelnen Daten der Knochenmineralgehaltmessung sind in den Tabellen 9 und 10 und in den Diagrammen 5 und 6 gezeigt.

Tabelle 9: Knochenmineralgehalt nach 14- tägiger Beobachtung

Messung	Nrf2 <sup>-/-</sup>	BMC (g)	Nrf2 <sup>+/+</sup>	BMC(g)
1	M1	0,033	M11	0,025
2	M2	0,025	M12	0,024
3	M3	0,033	M13	0,038
4	M4	0,031	M14	0,039
5	M5	0,033	M15	0,026
	Mittelwert	0,031	Mittelwert	0,030
	Standardabweichung	0,004	Standardabweichung	0,007

Diagramm 5:

**BMC- Messung nach 14- tägiger  
Beobachtung**

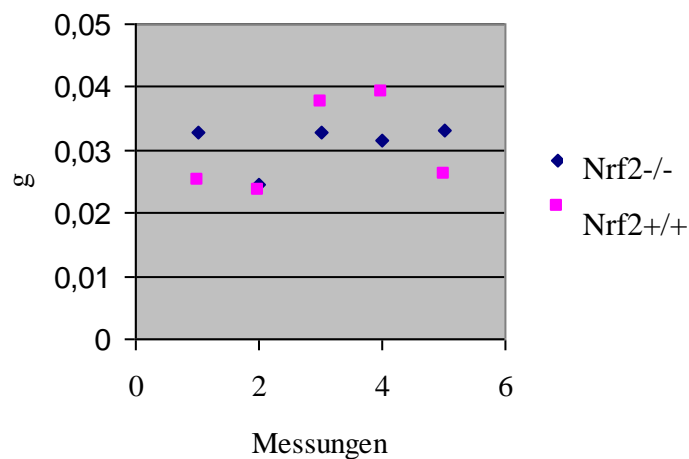
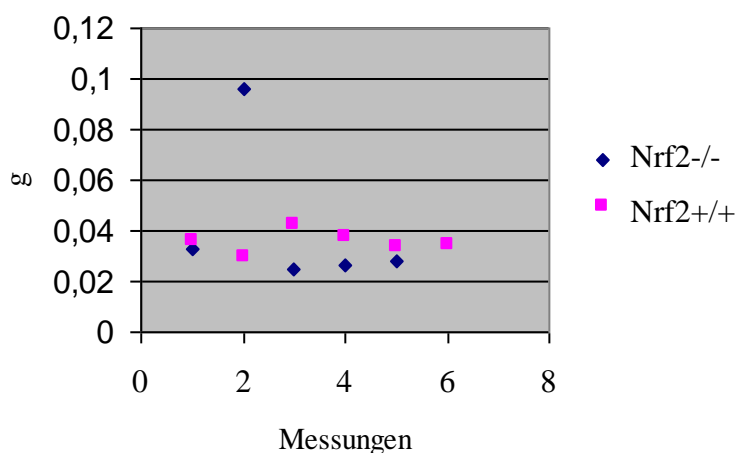


Tabelle 10: Knochenmineralgehalt nach 28- tägiger Beobachtung

Messung	Nrf2-/-	BMC (g)	Nrf2+/+	BMC (g)
1	M21	0,033	M31	0,036
2	M22	0,096	M32	0,030
3	M23	0,025	M33	0,043
4	M24	0,026	M34	0,037
5	M25	0,028	M35	0,033
6			M36	0,035
	Mittelwert	0,041	Mittelwert	0,036
	Standardabweichung	0,031	Standardabweichung	0,004

Diagramm 6:

**BMC- Messung nach 28- tägiger Beobachtung**

## 3.2.3 Fläche

Die Messung der Knochenflächen bei den Versuchstieren der Knock-out-Gruppe ergab für den 14- tägigen Beobachtungszeitraum  $0,38 \text{ cm}^2 \pm 0,02$ , und für die Knochenfläche der Wildtyp-Gruppe  $0,38 \text{ cm}^2 \pm 0,1$ . Das Ergebnis zeigte keine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ). Die einzelnen Messdaten sind in Tabelle 11 und im Diagramm 7 dargestellt.

Bei den Versuchsgruppen mit einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ergaben die Daten folgende Werte: Die Werte der Knock-out-Mäuse betragen  $0,3 \text{ cm}^2 \pm 0,07$  und die der Wildtyp-Mäuse  $0,38 \text{ cm}^2 \pm 0,04$ . Dieser Unterschied ist von statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Die Wildtypen hatten eine größere Kallusfläche. Die einzelnen Daten sind in Tabelle 12 und im Diagramm 8 ablesbar.

Tabelle 11: Knochenfläche nach 14- tägiger Beobachtung

Messung	Nrf2-/-	Fläche (cm <sup>2</sup> )	Nrf2+/+	Fläche (cm <sup>2</sup> )
1	M1	0,383	M11	0,301
2	M2	0,361	M12	0,331
3	M3	0,403	M13	0,473
4	M4	0,396	M14	0,508
5	M5	0,391	M15	0,262
	Mittelwert	0,387	Mittelwert	0,375
	Standardabweichung	0,016	Standardabweichung	0,109

Diagramm 7:

### Flächenmessung nach 14- tägiger Beobachtung

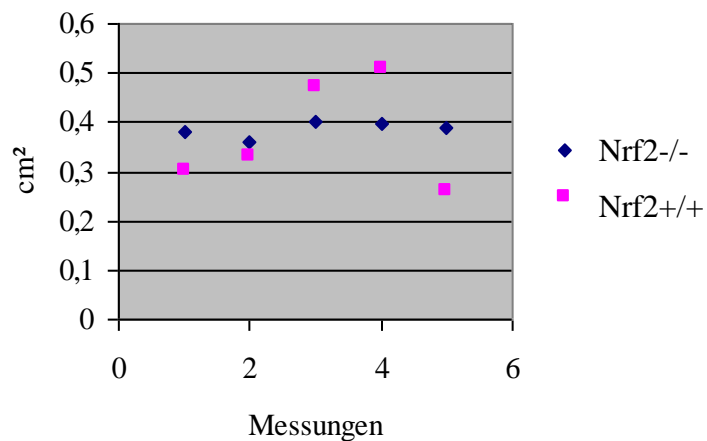
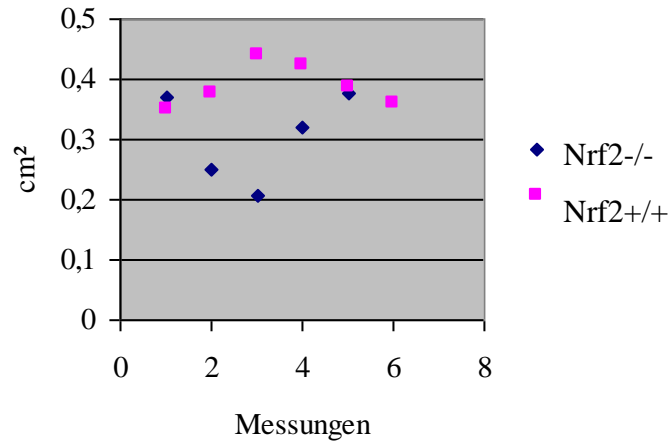


Tabelle 12: Knochenfläche nach 28- tägiger Beobachtung

Messung	Nrf2-/-	Fläche (cm <sup>2</sup> )	Nrf2+/+	Fläche (cm <sup>2</sup> )
1	M21	0,371	M31	0,349
2	M22	0,250	M32	0,376
3	M23	0,206	M33	0,440
4	M24	0,318	M34	0,422
5	M25	0,377	M35	0,388
6			M36	0,361
	Mittelwert	0,304	Mittelwert	0,389
	Standardabweichung	0,075	Standardabweichung	0,035

Diagramm 8:

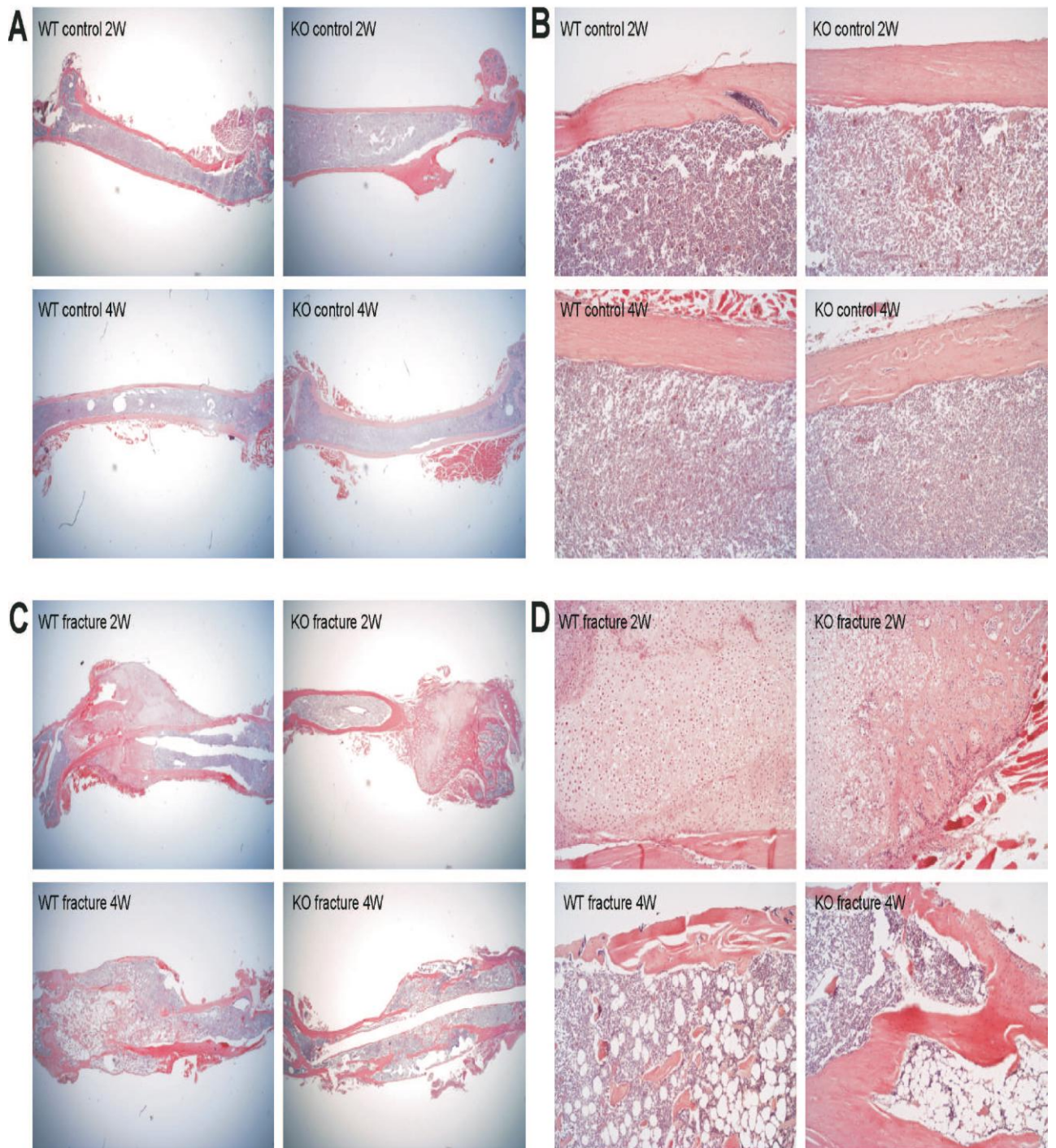
**Flächenmessung nach 28- tägiger  
Beobachtung**



### 3.3 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Femora zeigte eine geringere Frakturheilung bei den KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen (Abb.9). Am 14. und 28. Tag nach der Operation zeigten die KO-Tiere ein erniedrigtes Kallusvolumen und mehr knorpelige Anteile im Kallus als die Vergleichsgruppe. 14 Tage nach dem Eingriff waren bei den Wildtyp-Mäusen die Frakturen ausgeheilt und knorpeliges Gewebe war im Kallus nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu war die Heilung bei den KO-Mäusen noch nicht beendet.

Am 28. postoperativen Tag war das Remodelling bei den WT-Mäusen vollständig abgeschlossen. Bei den Knock-out-Mäusen war dagegen noch ein Kallus nachweisbar. Die Kortikalis der nichtfrakturierten Femora erschien bei den Knock-out-Versuchstieren inhomogener (Abb.9 D rechte Seite).



**Abbildung 9: HE- Färbung**

Repräsentative Schnitte der Knochen (A und B) und der Kallusgewebe (C und D) von Wildtyp- und Knock-out-Mausfemora (Originalvergrößerung: A und C 10- fach, B und D 400- fach). Die HE-Färbung zeigt ein erniedrigten Frakturkallus bei den Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Besonders die Menge des knorpeligen Kallus ist vermehrt. Die Qualität des umgebauten Knochens ist bei den *Nrf2*-KO-Mäusen unreifer als die der WT-Mäuse und die Kortikalis der nichtfrakturierten Femora ist inhomogener bei den KO-Mäusen verglichen mit den Wildtypen.



#### 4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, eine genaue Analyse des Frakturheilungsverhaltens von Mäusen vorzunehmen, die eine Knock-out Veränderung im Nrf2-Gen tragen. Diese Frage ist von entscheidender Bedeutung, da über ihre Beantwortung ein Hinweis über einen möglichen spezieübergreifenden Zusammenhang geliefert wird.

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, der bis dato nur wenig verstanden ist. Jeder Chirurg erinnert sich an einen Patienten mit einer beeinträchtigten Frakturheilung. Viele Patienten verlieren nach einer langen Periode von chirurgischen und konservativen Heilungsversuchen letztlich eine Gliedmaße. Diese Szenarien verlangen nach bestimmten Behandlungen, wie zum Beispiel der Applikation von osteoinduktiven und osteokonduktiven Substanzen. Mit Hochachtung vor diesen therapeutischen Absichten, ist es unweigerlich von Nöten das Wissen über die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu erweitern. Viele Studien handeln von Faktoren, die prädisponierend für eine beeinträchtigte Knochenentwicklung sind und beschrieben diesbezüglich mehrere Gendefekte wie zum Beispiel bei der Osteogenesis imperfecta (60). Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Studien und Berichte über genetische Mechanismen bei einer eingeschränkten Frakturheilung.

Für die vorliegende Untersuchung wurde ein Mausmodell ausgewählt, um den Einfluss des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf die Frakturheilung zu untersuchen. Die Maus im Tiermodell bietet die Möglichkeit, vielfältige genetische Veränderungen zu untersuchen, da ihr Genom vollständig entschlüsselt ist. Zusätzlich ist die Haltung von Mäusen kostengünstig und weithin verfügbar.

Die Untersuchung der Femurfraktur im Nagermode ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, wodurch dieses Modell heute sehr standardisiert verwendet werden kann (15,56). Einschränkungen dieses Modells liegen in der relativ schnellen Frakturheilung der Maus und in einer anderen biomechanischen Belastung des Femurs der Maus aufgrund ihrer Fortbewegung im Vierfüßlergang im Vergleich zum Menschen mit aufrechtem Gang. Die dem Menschen vergleichbare Belastung wird erst bei den höher entwickelten Primaten wie den Menschenaffen erreicht. Diese eignen sich aber nur bedingt für eine genetische Manipulation und ihre Haltung ist äußerst aufwändig.

In früheren Arbeiten ist der Einfluss von Nrf2 auf verschiedene reparative Mechanismen bei der Nrf2-KO-Maus gezeigt worden. Unter anderem konnte eine erhöhte Anzahl von Spontanfrakturen bei Nrf2-KO-Mäusen mit rheumatoider Arthritis beschrieben werden (61). Es liegt daher nah, dass das Fehlen von Nrf2 einen Einfluss auf die Knochenregeneration und Frakturheilung hat. Um diese These zu prüfen, implementierten wir eine geschlossene Fraktur im rechten Femur der Maus mit einer Drei- Punkt Biegeapparatur (56).

Das Nrf2-ARE System ist ein Mechanismus des Organismus zur Abwehr von oxidativem Stress. Es ist bekannt, dass Nrf2 eine wichtige Rolle bei der zelleigenen Abwehr gegen oxidative und elektrophile Schäden spielt, indem er zur Induktion von antioxidativen Enzymen und Phase II Enzymen führt (43). Mit Hilfe von Nrf2-Knock-out-Mäusen konnte die Bedeutung von Nrf2 für die Expression der antioxidativen Gene gezeigt werden. Die Nrf2-Knock-out-Mäuse exprimieren diese Gene auf deutlich niedrigerem Niveau und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber cancerogenen Substanzen (44). Zudem weisen diese Mäuse eine kaum verstärkte Expression von antioxidativen Enzymen als Reaktion auf oxidativem Stress auf (42). Daraus lässt sich folgern, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 für die Induktion der zelleigenen Abwehr gegen oxidativen Stress mitverantwortlich ist (42).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung nach Erzeugen einer standardisierten Fraktur im Femur der Maus zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tage untersucht. Dazu wurde zunächst die Mikrocomputertomographie herangezogen.

Die Mikrocomputertomographie ist inzwischen ein Standardverfahren zur Untersuchung der Knochenbruchheilung im Mausmodell. Viele Studien konnten neben der exakten Bestimmung des Kallusvolumens auch die trabekuläre Struktur des Knochens und das Verhältnis von neu gebildetem Knochen/Kallus zu echtem Lamellenknochen bewerten (70).

Obwohl in vielen Studien gezeigt wurde, dass die Mikrocomputertomographie vergleichbare Ergebnisse wie die konventionelle Histologie bereitstellt, weist sie Grenzen auf (72-74). Das Mikro-CT liefert keine Informationen über die Knochendynamik, wie Knochenresorption oder Knochenbildung (73,75).

Die Vorteile des Mikro-CTs liegen in der schnellen, nicht destruktiven und präzisen Beurteilung dreidimensionaler Knochenstrukturen. Es werden unbehandelte Proben verwendet, die anschließend für weitere Verfahren aufbereitet werden können. Da es sich um eine voll automatisierte Methode zur Quantifizierung der strukturellen Knochenbeschaffenheiten handelt, ist eine objektive und schnelle Ermittlung von Resultaten möglich (76). Im Vergleich zu histologischen Methoden besteht im Mikro-CT die Möglichkeit, größere Datensätze zu generieren. Durch die voll automatische Ergebniserzeugung, ist es möglich, die Daten zu reproduzieren.

Insgesamt sollte die Methode der Mikrocomputertomographie als Ergänzung und nicht als Alternative der konventionellen histologischen Methoden gesehen werden (75,76).

Mit den "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography" liegen Richtlinien der „American Society for Bone and Mineral Research“ vor, die zur Beurteilung der Knochenstruktur herangezogen werden können (71).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass mit der mikrocomputertomographischen Untersuchung ein Kallusvolumenunterschied zwischen den Nrf2<sup>-/-</sup> und den Nrf2<sup>+/+</sup> Versuchstieren, sowohl in der 14 Tage Versuchsgruppe als auch in der 28 Tage Versuchsgruppe, nachgewiesen werden kann. Die Nrf2-Wildtyp-Mäuse haben ein signifikant größeres Kallusvolumen als die Nrf2-Knock-out-Mäuse. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Fraktur der Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den der Knock-out-Mäusen fester verheilt.

Im Einklang damit konnten Healy et al. Zeigen, dass das Vorhandensein von Nrf2 zu einer positiven Knorpelzellintegration führt, da die Apoptoserate der Knorpelzellen sinkt (40).

Der Prozess der Kallusbildung kann in verschiedenen Phasen gestört werden. Die Knochenbruchheilung besteht aus verschiedenen, ineinander übergreifenden Phasen. Zu diesen Phasen gehört auch die Entzündung (29-31).

Es gibt Studien, die gezeigt haben, dass der Nrf2 Signalweg auf proentzündliche Stimuli reagiert und damit Gewebe vor Entzündungsschäden schützt (45-48). Damit scheint Nrf2 eine vermittelnde Rolle bei der Anpassung der Zelle auf entzündliche Stimuli zu haben. Ein Fehlen des Nrf2 kann somit eine überschießende Entzündungsreaktion hervorrufen. Dieses kann den adäquaten Ablauf der Frakturheilung beeinträchtigen und zu geringerer Kallusbildung führen. Die Nrf2-KO-Mäuse können durch deren niedrigere Kallusvolumina eine verminderte Frakturstabilität aufweisen. Es ist bereits beschrieben worden, dass Nrf2-Knock-out-Mäuse verschiedene pathologische Manifestationen entwickeln, wie z.B. lupusartiges Syndrom oder eine glomeruläre Nephritis (41). Es liegt also nahe, dass auch der Prozess der Knochenheilung beeinträchtigt sein kann.

Knochen kann auf zwei Arten entstehen, desmale und chondrale Ossifikation. Während der desmalen Ossifikation entsteht der Knochen direkt aus bindegewebigen Vorstufen. Während der chondralen Ossifikation dient als Vorstufe der hyaline Knorpel (36-39).

Weil Knorpel in der Entwicklung des Knochens eine entscheidende Rolle einnimmt und das Fehlen des Nrf2 Gens eine negative Auswirkung auf die Knorpelzellintegration zeigt (40), könnte man erwarten, dass die Nrf2-KO-Mäuse, eine geringere Knochendichte, ein geringeres Knochengewicht und eine geringere Knochenfläche haben. Die DXA-Scanuntersuchung kann solche Effekte aufdecken.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein DXA Scan Hologic Scanner verwendet. Dieses Gerät wird routinemäßig zur Untersuchung der Knochendichte beim Menschen eingesetzt. Sie wird hauptsächlich zur Knochendichtemessung verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Früherkennung des qualitativ noch normalen, quantitativ aber bereits

osteoporotisch veränderten Knochens. Diese Methode wird in der Medizin als Goldstandard bei der Osteoporosedagnostik angesehen (Leitlinien des Dachverbandes Osteologie DVO). Jedoch zeigte lediglich die Untersuchung der Knochenflächen in einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen einen signifikanten Unterschied. Auf Grund der zu kleinen Mausfemora, konnte das entsprechende Auswertungsprogramm des DXA-Scans die Knochen nicht adäquat eingrenzen. Sie mussten manuell vom Untersucher nachgezeichnet werden. Mehrmalige Messungen wurden durchgeführt, um den subjektiven Einfluss zu minimieren. Diese Fehlerquelle könnte der Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse in den Messungen der Knochenmineraldichte und des Knochenmineralgewichts sein, sowie in der Messung der Knochenfläche in dem 14-tägigen Beobachtungszeitraum. Für die korrekte Messung der Knochendichte muss daher ein Gerät benutzt werden, das speziell für Kleintiere modifiziert ist, wie das DXA-Gerät der Firma Sabre, Nordland/Stratec (Pforzheim), dieses könnte genauere Daten liefern.

Um die Frakturheilung zusätzlich zu untersuchen wurden histologische Schnittpräparate der frakturierten Knochen zu den beiden untersuchten Zeitpunkten hergestellt. Diese Technik gibt Informationen über die Mineralisierung des Knochens, die Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten und gibt Auskunft über Knochenbildung, Knochenresorption und stabile Knochenoberflächen. Doch obwohl zweidimensionale histomorphometrische Techniken viele Informationen des dynamischen Knochengewebes bereitstellen, können sie kein vollständiges Bild der dreidimensionalen Mikrostruktur des Knochens vermitteln (75). Weitere Nachteile sind die aufwändige Probenpräparation (77), sowie die aufgrund der Aufbereitungsmethode verhältnismäßig großen Abstände zwischen den einzelnen Schnitten. Hierdurch können vor allem kleine Veränderungen leicht übersehen werden (76). Bisher gilt jedoch die Histomorphometrie auf dem Gebiet der quantitativen Bestimmung von knöchernen Strukturparametern als Goldstandard (73). Hierzu wurde in der vorliegenden Untersuchung die Hartschliff-Technik angewendet. Diese erlaubt die Darstellung des kalzifizierten Gewebes (68). Zusätzlich wurden entkalzifizierte Schnitte angefertigt, die eine detaillierte Darstellung des nicht kalzifizierten Gewebes erlauben.

Aufgrund der heterogenen dreidimensionalen Struktur des Frakturkallus ist es schwierig, die verschiedenen Gewebstypen standardisiert in zweidimensionalen Schnittpräparaten zu analysieren. Longitudinale Schnittpräparate im Bereich des maximalen Femurdurchmessers ermöglichen hierbei dennoch eine reproduzierbare und repräsentative Darstellung der Kallusgröße sowie der Gewebeszusammensetzung des Frakturkallus. Entsprechend wurde in Anlehnung an vergleichbare Frakturstudien an Mäusen eine longitudinale diaphysär mittige Schnittführung gewählt, um den Frakturkallus histologisch auszuwerten (69).

Die angefertigten Toluidinblau- und HE- Färbungen zeigen einen vermehrten Anteil des knorpeligen Kallus in der Fraktur der Knock-out-Mäuse. Beide Untersuchungsmethoden demonstrieren, dass die Frakturheilung stadiengerecht und mit vollständiger Verknöcherung einhergeht. Sowohl die kalzifizierte als auch die entkalzifizierte Histologie belegt eine verminderte Knochenkallusbildung im Nrf2<sup>-/-</sup> Tier. Insgesamt wiesen die Nrf2<sup>-/-</sup> Mäuse eine verlangsamte Frakturheilung auf. Zusätzlich war die Kortikalis der nichtfrakturierten Femora bei den Knock-out-Versuchstieren inhomogener. Die vorliegenden Ergebnisse der Mikro-CT und der histologischen Untersuchungen stehen im Einklang miteinander, die Qualität des umgebauten Knochens der Knock-out-Mäuse ist unreifer als die der Wildtyp-Mäuse. Um die dargestellten Befunde weiter zu untermauern müssen biomechanische Untersuchungen vorgenommen werden. Diese sind der Gegenstand der weiterführenden Studien.

## **5 Zusammenfassung**

Einleitung:

Die Fraktur spielt im medizinischen Alltag eine wichtige Rolle. Auf der einen Seite steht das Leid des Patienten mit Immobilisation, Verlust von Lebensqualität und Belastbarkeit. Dem gegenüber stehen die medizinische Versorgung mit einer Operation oder konservativen Behandlungen und die postoperative Nachbehandlung, insbesondere auch vor dem Hintergrund sozioökonomischer Faktoren in der heutigen Zeit. Alle diese Aspekte unterstreichen die Bedeutung einer ungestörten Frakturheilung.

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess indem viele Einflüsse eine Rolle haben. Ist die Heilung gestört, können weitere den Patienten und seine Umgebung betreffende Probleme auftreten, die Pseudarthrose ist ein Beispiel hierfür. Einer der wichtigsten Störfaktoren ist die überschießende Radikalbildung während der Phase der Reperfusion und Revaskularisierung. Der menschliche Körper bildet mehrere antioxidative Faktoren die diese Radikale unschädlich machen. Viele werden über den ARE Promotor transkribiert. Dieser Promoter wird über das Nrf2 Gen aktiviert. In der vorliegenden Studie wurde durch Inaktivierung von Nrf2 für Knochen und Knorpelmatrix die morphologischen und molekularen Merkmale veränderter Knochenbruchheilung untersucht.

Material und Methoden:

Als Versuchstiere wurden eigens für Forschungszwecke gezüchtete Mäuse benutzt. Es handelte sich um einen Knock-out des Nrf2. Die Wildtyp-Kontrolltiere waren Wurfgeschwister der Knock-out-Mäuse. Alle Tiere unterlagen denselben prä-, intra- und postoperativen Verhältnissen.

Zur Durchführung der Studie wurden standardisierte Oberschenkelquerfrakturen mit einer eigens angefertigten Guillotine nach dem Modell nach Bonnarens und Einhorn erzeugt.

Mit Hilfe von mikrocomputertomographischen Untersuchungen konnten wir die Kallusgrößen der Versuchsgruppen darstellen. Um die Knochendichte, -fläche und den Knochenmineralgehalt darzustellen wählten wir die DXA-Untersuchung. Letztlich konnten wir mit der histologischen Untersuchung auf mikroskopischer Ebene Zellen und Gewebestandteile darstellen und vergleichen.

Ergebnisse:

Durch die vorliegende Studie konnte nun gezeigt werden, dass dem Nrf2- Gen für die Kallusbildung und die Qualität des neugebildeten Knochens möglicherweise eine wichtige Rolle zukommt. Durch mikrocomputertomographische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Nrf2 Gens zu einer signifikant geringeren Kallusbildung führt. Dieses Ergebnis wurde durch histologische Untersuchungen und Mikroradiographie, in denen die verminderte Knochenneubildung gezeigt werden konnte, verifiziert. Lediglich die DXA-Untersuchungen konnten keine ausreichenden signifikanten Unterschiede darstellen.

Schlussfolgerung:

Mit dieser Studie konnten Hinweise darauf gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine positive regulatorische Aufgabe bei der Frakturheilung hat. Nrf2 könnte daher auch ein therapeutisches Target bei der Behandlung von verzögerter und ausbleibender Frakturheilung sein.

Weitere Studien sind notwendig um die Rolle des Nrf2/ARE Systems in mesenchymalen Stammzellen, Chondrozyten und Osteoblasten während des regenerativen Prozesses auf molekularer Ebene zu definieren. Weiterführende klinische Studien müssen zeigen, in wie weit Nrf2 auch in der Humanmedizin einen Einfluss auf die Frakturheilung hat. In diesem Rahmen kann dann auch seine Bedeutung für die Ausbildung von Pseudarthrosen untersucht werden.

## 6 Referenzen

1. Bourque WT, Gross M, Hall BK. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci.* 1992;42:369-374
2. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res.* 1993;11:305-312
3. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 1994;651-659
4. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, et al. Hedgehog signalling molecules in bone marrow cells at the initial stages of fracture repair. *Biochem Biophys Res Comm.* 1992; 262:443-451
5. Nakase T, Sukimoto M, et al. Switch of osteonectin and osteopontin mRNA expression in the process of cartilage-to-bone transition during fracture repair. *Acta Histochem.* 1998;100:287-295
6. Yamagiwa H, Tokunaga K, Hayami T, et al. Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase 3) is induced during fracture healing in mice. *Bone.* 1999;25:197-203
7. Bourque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol.* 1993;37:573-579
8. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17:513-520
9. Fuji H, Kitazawa R, Maeda S, et al. Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Bio.* 1999;112:131-138
10. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop.* 1993;297:23-27
11. Ohta S, Muramatsu H, Senda T, et al. Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1132-1144
12. Hinoi E, Fujimori S, Wang L, Hojo H, Uno K, and Yoneda Y. Nrf negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2006; 281:18015-24
13. Hinoi E, Takarada T, Fujimori S, et al. Nuclear factor E2 p45-related factor 2 negatively regulates chondrogenesis. *Bone* 2007; 40:337-44.
14. Jackson RW, Reed CA, Israel JA, Abu Keer FK, Garside H: Production of a standard experimental Fracture. *Can J surg* 13;415-420, 1970
15. Bonnarens F; Einhorn TA, Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 1984; 2:97-101
16. Hitchon CA, El Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:265-278
17. El Gabalawy HS, Wilkins JA. Anti-Sa- antibodies: prognostic and pathogenetic significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:86-89
18. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox signal.* 2005;7:385-394
19. Böcker, Denk, Heintz Pathologie, 3. Auflage Urban und Fischer Verlag S.1044/1045
20. Böcker, Denk, Heintz Pathologie, 3. Auflage Urban und Fischer Verlag S.1045/1046
21. Bax B.E, Wozney J.M., Ashhurst D.E. Bone morphogenetic protein 2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif tissue int* 65, 83-89 (1999)
22. Fujimoto R., Tanizawa T., Local effects of transforming growth factor beta1 on rat calvaria. *J. Bone Miner Metab* 17, 11.17 (1999)
23. Lee J.Y., Peng H. Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther* 13, 1201-1211 (2002)
24. Marco Gesicki, Experimentelle Untersuchung zum Einfluss der Sexualhormone Östrogen und Testosteron auf die Frakturheilung, 2005
25. Schenk RK, Perren: Biologie und Biomechanik der Frakturheilung SM an Röhrenknochen als Grundlage der Osteosynthese. *Hefte Unfallheilkd:* 29-41 (1977)
26. Willenegger H, Perren SM, Schenk R: Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung. *Chirurg* 42: 241- 252 (1971)
27. Rhinelander FW: The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg Am* 50: 784-800 (1968)
28. Braun W, Ruter A: Fracture healing Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99: 59-67 (1996)
29. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA.: Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14: 1805-1815 (1999)
30. Bourque WT, Gross M, Hall BK: A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 42: 369-374 (1992)

31. Klaushofer K, Peterlik M: *Pathophysiologie der Knochenbruchheilung. Radiologe* 34: 709-714 (1994)
32. Mc Kibbin B: *The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br* 60: 150-162 (1978)
33. Bruckner UB, Rosch M, Kelbel MW, Gebhard F: *Prostanoid release and lipid peroxidation in patients with thoracic trauma. Zentralbl Chir* 124: 144-158 (1999)
34. Amling M, Posl M et al *Rescue of skeletal phenotype of vitamin d receptor ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis. Endocrinology* 140,4982-4987 (1999)
35. Kiebzak G.M., Smith R. et al *Bone status of senescent male rats, J Bone Miner Res* 3, 37-45 (1988)
36. Wasmer, G., Pförringer W. *Ultrastruktur und Biochemie der Epiphysenfuge, In: "Die Epiphysenfugen", Pförringer W., Rosemeyer B.(Hrsg.) Perimed Fachbuch- Verlagsgesellschaft, Erlangen, 1987, 1. Auflage, 25-52*
37. Putz, R., *Entwicklung und Wachstum der Epiphysen. Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 134 (1996) 391-395
38. Milz, S., Boszczyk, A., Putz, R. *Entwicklung und funktionelle Struktur der Epiphysenfugen. Orthopäde* 31(2002) 835-840
39. Dallek, M., Meenen, N., Möller, K.F., Jungbluth, K.H. *Die Kollagenfasertextur in Epi- und Apophysenfugen als morphologischer Ausdruck der Transformation von Druck- in Zugkräfte und umgekehrt. In: "Neuere Ergebnisse in der Osteologie", Willert, H.G., Henk, F.H.W. (Hrsg.), Springer Heidelberg, 1989,*
40. Healy Z.R., Lee N.H., Gao X., Goldring M.B., Talalay P., Kensler T.W. and Konstantopoulos K., *Divergent responses of chondrocytes and endothelial cells to shear stress: cross-talk among COX-2, the phase 2 response, and apoptosis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005), pp. 14010–14015.
41. Ma Q., Battelli L. and Hubbs A.F., *Multiorgan autoimmune inflammation, enhance lymphoproliferation and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2, Am. J. Pathol.* 168 (2006), pp. 1960–1974
42. Kobayashi M., Yamamoto M., *Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. Antioxid Redox Signal.* 2005 Mar-Apr;7(3- 4):385-94.
43. Kensler T.W., Wakabayashi N. and Biswal S., *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 (2007), pp. 89–116
44. Ramos-Gomez M., Kwak M.K., Dolan P.M., Itoh K., Yamamoto M., Talalay P. and Kensler T.W. (2001). *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor- deficient mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3410-3415.
45. Arisawa T., Tahara T., Shibata T., Nagasaka M., Nakamura M., Kamiya Y., Fujita H., Hasegawa S., Takagi T., Wang F.Y., Hirata I. and Nakano H., *The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis, Int. J. Mol. Med.* 19 (2007), pp. 143-148.
46. Chen X.L., Varner S.E., Rao A.S., Grey J.Y., Thomas S., Cook C.K., Wasserman M.A., Medford R.M.,
47. Jaiswal A.K. and Kunsch C., *Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism, J. Biol. Chem.* 278 (2003), pp. 703–711.
48. Cho H.Y., Jedlicka A.E., Reddy S.P., Kensler T.W., Yamamoto M., Zhang L.Y. and Kleeberger S.R., *Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002), pp. 175–182.
49. Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., et al. (1997). *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313-322.
50. Itoh K., Ishii T., Wakabayashi N. and Yamamoto M. (1999). *Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress, Free Radic. Res.* 31, 319- 324.
51. Gamos-Gomez M., Kwak M.K., Dolan P.M., Itoh K., Yamamoto M., Talalay P. and Kensler T.W. (2001). *Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor- deficient mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3410-3415.
52. Wakabayashi N., Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kang M.I., Kobayashi A., Yamamoto M., Kensler T.W. and Talalay P. (2004). *Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 2040-2045.
53. Kobayashi M., Yamamoto M., *Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. Adv Enzyme Regul.* 2006;46:113-40. Epub 2006 Aug 2.
54. Kataoka K., Handa H. and Nishizawa M., *Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds, J. Biol. Chem.* 276 (2001), pp. 34074–81.
55. Kang M. I., Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S. G. and Yamamoto M. (2004). *Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101, 2046-2051.
56. Manigrasso, O'Connor, *Characterization of a closed fracture model in mice* 2004



57. Romeis, B., Bock, P., Denk, H., Romeis *Mikroskopische Technik*. Vol. 17. 1989, München, Baltimore: Urban und Schwarzenberg
58. *The FASEB Journal*. 2005;19:1061-1066, *Nrf2, a multi-organ protector?* Jong-Min Lee, Jiang Li, Delinda A. Johnson
59. Neumeister, B., Besenthal, I., Liebich, H., *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 2000: Urban und Fischer Verlag
60. Ben Amor IM, Glorieux FH, Rauch F *Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta*. *J Osteoporos* 211:540178
61. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, Hassenpflug J, Freitag-Wolf S, Varoga D, Lippross S, Pufe T *Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice*. *Ann Rheum Dis* 70(5):844-50.
62. White AA, 3rd, Panjabi MM und Southwick WO. *The four biomechanical stages of fracture repair*. *J Bone Joint Surg Am* 59: 188-192., 1977.
63. Kopman CR, Boskey AL, Lane JM, Pita JC und Eaton B, 2nd. *Biochemical characterization of fracture callus proteoglycans*. *J Orthop Res* 5: 7-13., 1987.
64. Hiltunen A, Vuorio E & Aro HT (1993) *A standardized experimental fracture in the mouse tibia*. *J Orthop Res* 11: 305-312
65. Cheal EJ, Mansmann KA, DiGioia AMr, Hayes WC & Perren SM (1991) *Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy*. *J Orthop Res* 9: 131-142
66. Rossant J & Nagy A (1995) *Genome engineering: the new mouse genetics*. *Nat Med* 1: 592-594
67. Cheung KM, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D & Cheah KS (2003) *An externally fixed femoral fracture model for mice*. *J Orthop Res* 21: 685-690
68. *(A technique for the study of the internal structure of calcified tissues)*. KNAPP DE, AVERY JK, COSTICH ER. *J Dent Res*. 1958 Sep-Oct;37(5):880-5.)
69. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO & Einhorn TA (2005) *Application of histomorphometric methods to the study of bone repair*. *J Bone Miner Res* 20: 1715-1722
70. *Bone*. 2012 Jun;50(6):1357-67. Epub 2012 Mar 17. *J Bone Miner Res*. 2009 Feb;24(2):196-208
71. *Bone Miner Res* 2010 Jul;25(7):1468-86. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R.)
72. Mitton, D., Cendre, E., Roux, J.P., Arlot, M.E., Peix, G., Rumelhart, C., Babot, D., Meunier, P.J. (1998): *Mechanical properties of ewe vertebral cancellous bone compared with histomorphometry and high-resolution computed tomography parameters*. *Bone* 22(6), 651-658.
73. Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der, P.G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Rügsegger, P. (1998): *Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography*. *Bone* 23(1), 59-66.
74. Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H.E., Hara, T. (1997): *A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry*. *Calcif Tissue Int* 61(6), 493-498
75. Cooper, D.M.L., Turinsky, A.L., Sensen, C.W., Hallgrímsson, B. (2003): *Quantitative 3D analysis of the canal network in cortical bone by microcomputed tomography*. *The anatomical record* 274B, 169-179.
76. Wedemeyer, C., Xu, J., Neuerburg, C., Landgraeber, S., Malyar, N.M., von Knoch, F., Gosheger, G., von Knoch, M., Lör, F., Saxler, G. (2007): *Particle induced osteolysis in three-dimensional micro-computed tomography*. *Calcif Tissue Int*. 81(5), 394-402.
77. Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., Kalender, W. (1999): *Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure*. *Radiologe*. 39(3), 203-212.

## 7 Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen

Abb. 1:	Einige Funktionen des Nrf2 Gens im menschlichen Organismus	7
Abb. 2:	Modell nach Bonnarens	9
Abb. 3:	Darstellung des Operationsverlaufs	10
Abb. 4:	Röntgenbilder	11
Abb. 5:	Mikrocomputertomograph	12
Abb. 6:	Mikro-CT Bilder	13
Abb. 7:	DXA-Scan	14
Tabelle 1:	Alkoholreihe der entkalkifizierten Histologie	15
Tabelle 2:	Alkoholreihe der kalzifizierten Histologie	16
Tabelle 3:	Kallusvolumina Nrf2 <sup>-/-</sup> , 14 Tage	21
Tabelle 4:	Kallusvolumina Nrf2 <sup>+/+</sup> , 14 Tage	21
Diagramm 1:	Kallusgröße, 2Wochen	22
Tabelle 5:	Kallusvolumina Nrf2 KO <sup>-/-</sup> , 28 Tage	22
Tabelle 6:	Kallusvolumina Nrf2 KO <sup>+/+</sup> , 28 Tage	23
Diagramm 2:	Kallusgröße, 4Wochen	24
Abb. 8:	μCT- Messungen der frakturierten Knochen	25
Tabelle 7:	Knochenmineraldichtemessung nach 14- tägiger Beobachtung	26
Diagramm 3:	BMD- Messung nach 14- tägiger Beobachtung	27
Tabelle 8:	Knochenmineraldichtemessung nach 28- tägiger Beobachtung	27
Diagramm 4:	BMD- Messung nach 28- tägiger Beobachtung	28
Tabelle 9:	Knochenmineralgehalt nach 14- tägiger Beobachtung	28
Diagramm 5:	BMC-Messung nach 14- tägiger Beobachtung	29
Tabelle 10:	Knochenmineralgehalt nach 28- tägiger Beobachtung	29
Diagramm 6:	BMC- Messung nach 28- tägiger Beobachtung	30
Tabelle 11:	Knochenfläche nach 14- tägiger Beobachtung	30
Diagramm 7:	Flächenmessung nach 14- tägiger Beobachtung	31
Tabelle 12:	Knochenfläche nach 28- tägiger Beobachtung	31
Diagramm 8:	Flächenmessung nach 28- tägiger Beobachtung	32
Abb. 9:	HE- Färbung	33

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Seekamp gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seinen hilfreichen Rat bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. S. Lippross gebührt mein größter Dank für die Überlassung des Themas, für die stete Betreuung, für die wertvollen Ratschläge und für die intensive Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

Dankbar bin ich den Herren Prof. Dr. M. Heller und Prof. Dr. rer. nat. CC Glüer, experimentelle Radiologie des UKSH Campus Kiel, für die Unterstützung bei der Bildgebung, sowie Herrn Dipl. Physiker C. Graeff für seine Hilfe im Bereich der CT- Untersuchungen.

Ich bedanke mich vielmals bei den Herren Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Wiltfang und Prof. Dr. med. Y. Acil aus der Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie des UKSH Campus Kiel für die freundliche Bereitstellung der Geräte für die histologischen Untersuchungen.

Mein Dank gebührt den wissenschaftlichen Mitarbeitern um die Arbeitsgruppe von Dr. Lippross, deren Mitwirken ein großer Gewinn für diese Arbeit war. In alphabetischer Reihenfolge: Katrin Lange, Gabriele Nessenius, Dr. rer. nat. Nadine Steubesand.

Ferner möchte ich den Mitarbeiterinnen der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel bedanken, die so freundlich waren mir bei den Operationen zu helfen und ohne deren liebevolle Mitpflege der Versuchstiere die Arbeit nicht möglich

gewesen wäre. In alphabetischer Reihenfolge: Inga Gehlsen, Ines Jurgasch, Birgit Reichmann.

Dankbar bin ich ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Professor Seekamp, die mir durch zahlreiche anregende Diskussionen und durch das freundschaftliche Klima immer wieder Freude bei der Erstellung dieser Arbeit bereitete.

Mein herzlicher Dank gebührt meinen Eltern Sakir und Bediriye Özdogru, die mir das Studium ermöglicht und die Medizin lieben gelehrt haben.

Mein liebevollster Dank gehört meinem Mann Dr. med. dent. Muhammad Ayub, ohne dessen konsequente und liebevolle Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

## 9 Tierversuchsgenehmigung

Ministerium für Landwirtschaft,  
Umwelt und ländliche Räume  
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |  
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn  
Dr. Sebastian Lippross  
Klinik für Unfallchirurgie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Arnold-Heller-Str. 7  
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 29.05.2007  
Mein Zeichen: V 312-72241.121-9 (43-4/07)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

### nachrichtlich:

Herrn PD Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

13. Juli 2007

### **Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Sehr geehrter Herr Dr. Lippross,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, ber. S. 1313), zuletzt geändert durch Gesetz vom 21. Dezember 2006 (BGBl. I S. 3294), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Die Rolle des Transkriptionsfaktors Nrf2 bei der Frakturheilung  
zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 40 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Dezember 2008 befristet.  
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr Dr. Sebastian Lippross

4. Sein Stellvertreter:  
Herr Dr. Christoph Jan Wruck
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:  
Herr PD Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:  
Keine.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

#### **Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

  
Buttchereit

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |  
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn  
Dr. Sebastian Lippross  
Klinik für Unfallchirurgie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Arnold-Heller-Str. 3  
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: Oktober 2009

Mein Zeichen: V 312-72241.121-9 (93-7/09)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128  
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß  
Tierschutzbeauftragter der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Olshausenstraße 40  
24098 Kiel

17. Nov. 2009

16. November 2009

## Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Lippross,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften des  
verminderten Frakturkallus der Nrf-2 knock-out Maus

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 40 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 30. November 2011 befristet.  
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:  
Herr Dr. Sebastian Lippross

4. Sein Stellvertreter:  
Herr PD Dr. Deike Varoga
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:  
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:  
Die Genehmigung beschränkt sich auf 10 Tiere pro Gruppe. Weitere Tiere sind bei Bedarf mit entsprechender Begründung gesondert zu beantragen.

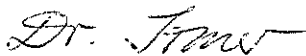
Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

#### **Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Irmer



## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Ferda Ayub-Özdogru, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- E2 p25- related factor 2 auf die Frakturheilung der Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ist mir bekannt.

Kiel, den 22.01.2013

Ferda Ayub-Özdogru

## 11 Curriculum vitae

Name	Ferda Ayub-Özdogru geb. Özdogru
Geburtsdatum	09.02.1986 in Bremerhaven
Eltern	Sakir Özdogru, Schweißer Bedriye Özdogru, geb. Baskaya, Hausfrau
Geschwister	Esra Güdük, geb. Özdogru, Ärztin Feyza Aydogan, geb. Özdogru, Studentin Fikriye Özdogru, Studentin
Familienstand	Verheiratet seit Dezember 2007
Ehemann	Dr. med. dent. Muhammad Ayub, Zahnarzt
Konfession	Islam
Kinder	Yahya Ayub, geboren 31.05.2009 Ismail Ayub, geboren 21.04.2012

### Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel:

Oktober 2004	Beginn des Studiums
August 2006	Bestehen des Ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
Mai 2011	Bestehen des Zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
Note: gut (2,5)	

### Ausführung und Fertigstellung der Doktorarbeit:

2008-2013	Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor-E2 p25- related factor 2 auf die Frakturheilung der Maus
-----------	--

### Praktisches Jahr:

1.Tertial: 22.02.2010 - 13.06.2010	Städtisches Krankenhaus Kiel I. und III. Med. Klinik Innere Medizin
2.Tertial: 14.06.2010 – 03.10.2010	Städtisches Krankenhaus Kiel Chirurgische Klinik
3.Tertial: 04.10.2010 – 23.01.2011	UKSH Campus Kiel Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

**Famulaturen**

27.02.2007 – 14.03.2007	Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin in der Seepark Klinik Debstedt
18.02.2008 – 16.03.2008	UKSH Campus Kiel Innere Medizin
04.08.2008 – 17.08.2008	UKSH Campus Kiel Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
15.09.2008 – 10.10.2008	UKSH Campus Kiel Gynäkologie und Geburtshilfe
10.09.2009 – 10.10.2009	Allgemeinarztpraxis Frau Dr. Kerstin Kramer

**Schulische Ausbildung:**

1992 -1996	Besuch der Grundschule in Bremerhaven
1996 -1998	Besuch der Orientierungsstufe in Bremerhaven
1998 -2002	Besuch des Gymnasiums in Bremerhaven
Februar 2002	Klassenhochstufung von 10/1 auf 11/2
2002- 2004	Besuch der Oberstufe in Bremerhaven

Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife: Notendurchschnitt 1,4

**Sprachkenntnisse:**

Türkisch	Muttersprache, fließend
Deutsch	Muttersprache, fließend
Englisch	fließend
Arabisch	ausreichend
Französisch	Grundkenntnisse