

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und
Biophysik
(LeiterIn: Univ.Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold Erben)

Fibrose-Entwicklung in der Niere in einem experimentellen Chronic kidney disease-Modell in der Maus

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien
vorgelegt von

Sarah Katharina Gregor

Wien, im August 2022

Betreuer: Univ.Prof. Dr. med. Dr. med. vet Reinhold Erben

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik

Gutachter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Herbert Weissenböck, Dipl.ECPHM

Institut für Pathologie

Inhalt

1	Einführung	1
1.1	Niere	1
1.1.1	Anatomie	1
1.1.2	Physiologie	3
1.2	Chronische Niereninsuffizienz	4
1.2.1	Krankheitsbild der CKD	5
1.2.2	Nierenfibrosen	6
1.3	Mäuse	7
1.4	CKD-Modelle:	8
2	Material und Methode	13
2.1	Mäuse	13
2.2	Operation	13
2.3	Organ Fixierung und Einbettung	17
2.4	Schneiden	17
2.5	Färben	18
2.5.1	H&E-Färbung von Paraffinschnitten	18
2.5.2	PICRO-SIRIUS-RED-Färbung	20
2.6	Auswertung	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Fibrose	23
4	Diskussion	28
5	Zusammenfassung	32
6	Summary	33
7	Literaturverzeichnis	34
8	Liste der Abbildungen und Tabellen	37
9	Abkürzungsverzeichnis	38

1 Einführung

In den letzten Jahren hat die Zahl der Nierenerkrankungen sowohl bei Menschen als auch bei unseren Haustieren, insbesondere Katzen und Hunden, zugenommen. Was alle Erkrankungen der Niere gemeinsam haben, insbesondere die chronische Nierenerkrankung, ist die Entstehung von Fibrose in der Niere.

Deshalb wollten wir mit diesem Versuch zeigen, wie sich eine 5/6-Nephrektomie auf die Entstehung von Fibrose bei C57BL6/N Mäusen auswirkt. Sowohl das gewählte Modell als auch die von uns gewählten Mäuse gehören zu den gängigsten ihrer Art. Weiters ist sich die Literatur nicht immer einig in Bezug auf eine 5/6-Nephrektomie bei C57BL6/N Mäusen und die Bildung von Fibrose. Es wurden 62 männliche C57BL6/N Mäuse gewählt, von denen 32 einer 5/6 Nephrektomie unterzogen wurden und als Kontrollgruppe 30 Mäuse nur zum Schein operiert. Der Versuch ging über einen Zeitraum von 12 Wochen, wobei jeweils in Woche vier, acht und zwölf Gruppen von Tieren euthanasiert wurden. Die entnommenen Nieren wurden mittels HE und PSR gefärbt und sowohl histologisch als auch statistisch ausgewertet. Anhand unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass es zur Entstehung von Nierenfibrose kommt. Dies zeigt, dass das gewählte Modell unsere Erwartungen erfüllt und in weiteren Versuchen für die Simulation einer CKD herangezogen werden kann. Dafür spricht zusätzlich die, in diesem Versuch, 100% Überlebensrate nach der 5/6-Nephrektomie. Um statistisch auswertbare Schlüsse zu ziehen, empfiehlt es sich noch weitere Versuche durchzuführen, insbesondere ob es einen Unterschied in der Verwendung von C57BL6/N und C57BL6/J Mäusen gibt.

1.1 Niere

1.1.1 Anatomie

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, das sich je nach Tierart sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Größe unterscheidet. Die gängigste Form ist am besten mit einer Bohne zu vergleichen, nur Pferde (rechte Niere ist herzförmig) und Rinder (oval und mit interlobären Furchen (Vollmerhaus 2004) bilden die Ausnahme. Das Gewicht nimmt in etwa 0,25% der Körpermasse ein (Gille 2008) und die Farbe ist, je nach dem, wie stark die Niere mit Blut gefüllt ist, zwischen hell gelbrot bis dunkel blaurot (Vollmerhaus 2004). Sie befindet sich im

Retroperitoneum, wo sie, zusammen mit der Nebenniere, eingebettet in einer Fettkapsel (*Capsula adiposa*) liegt (Kurz und Wagner 2017).

Grob kann man die Niere in drei Teile unterteilen:

Die Nierenkapsel (*Capsula fibrosa*), das Nierenparenchym und das Nierenbecken.

Die *Capsula fibrosa* umhüllt das Parenchym fest, dies führt dazu, dass bei einem Druckanstieg innerhalb der Niere sich die Kapsel nicht ausdehnen kann und es somit in weiterer Folge zu Organschäden kommen kann.

Das Nierenparenchym lässt sich noch einmal in zwei Bereiche aufteilen, in eine Nierenrinde (*Cortex renis*) und das Nierenmark (*Medulla renis*). Das Nierenmark ist in sogenannte *Pyramides renales* gegliedert, wobei die Spitze dieser Pyramiden in das Nierenbecken hineinragen (Nickel et al. 1982). Das Nierenbecken verjüngt sich zum Harnleiter (*Ureter*) und mündet in die Harnblase (*Vesica urinaria*) (Vollmerhaus 2004). Zusätzlich besitzt die Niere einen Hilus (*Hilus renalis*) durch welchen die Arterie (*A.renalis*) eintritt und die Vene (*V.renalis*) austritt. Weiters erfolgt hier die nervale Versorgung, sympathisch über den *Nervus splanchnicus minor* und parasympathisch der *Nervus vagus* (Gille 2008). Die *Arteria renalis* entspringt direkt aus der Aorta (Gille 2008), teilt sich in *Arteriae interlobares renis* welche sich wiederum in *Arteriae arcuatae* verzweigen, bevor diese in die *Arteriae interlobulares* übergehen. Zuletzt teilen sich die Arterien in afferente Arteriolen auf und führt zu den Glomeruli, in welchen der Primärharn gefiltert wird (Kurz und Wagner 2017).

Besonders hervorzuheben sind die Nephronen, welche die funktionelle Einheit der Niere bilden. Ein Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen und den dazugehörigen Tubuli (Fromm und Gäbel 2005). Außen haben die Nephronen, durch Einstülpung, eine doppelwandige Kapsel, die Bowman-Kapsel oder *Capsula glomeruli*, in welcher der *Glomerulus*, ein Kapillarknäuel, liegt (Gille 2008). Dies ist der Grund, weshalb eine Niere die gleiche Anzahl sowohl an Nephronen als auch *Glomeruli* besitzt. Jeder *Glomerulus* besteht aus drei verschiedenen Arten von Zellen, Endothelzellen, Podozyten und Mesangiumzellen (Kurz und Wagner 2017).

Glomerulus und Bowman Kapsel bilden zusammen das Nierenkörperchen (*Corpusculum renis*) (Gille 2008). Es ist zwischen 0,1 und 0,3 mm groß und kommt in unterschiedlicher Anzahl, je nach Tierart, vor, wobei die Katze mit 200 000 am wenigsten besitzt (Nickel et al. 1982).

Anschließend kommt der *proximale Tubulus*, zu welchem sich die *Capsula glomeruli* verjüngt. Dies ist der dickste Abschnitt und umfasst knapp 50 % der gesamten Länge des Nephrons. Die Henle-Schleife verbindet das gerade Ende des *proximalen Tubulus* mit dem *distalen Tubulus*, wobei der *distale Tubulus* in zwei Abschnitte unterteilt werden kann, den *Pars recta* und einen *Pars convoluta*. Bevor der *Pars recta* in den *Pars convoluta* übergeht, berührt er, als sogenannte *Macula densa*, noch einmal den *Glomerulus*.

Das Konvolut des *distalen Tubulus* bildet zusammen mit dem Verbindungstubulus den letzten Abschnitt. Das Verbindungsstück, verbindet, wie der Name bereits sagt, das Nephron mit dem Sammelrohr (Kurz und Wagner 2017).

1.1.2 Physiologie

Im Wesentlichen hat die Niere mehrere Aufgaben: Die Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten, zu denen Ammoniak, Harnstoff, Oxalat, Harnsäure und Kreatinin gehören, ist eine davon. Ein weiterer, nicht unwichtiger Faktor ist, dass viele körperfremde Substanzen, wie Medikamente oder Toxine von der Niere ausgeschieden werden.

Weiters ist sie zuständig für die Konservierung und Rückresorption von Substanzen, die für den Körper wichtig sind. Rückresorbiert wird nicht nur Wasser, sondern auch viele anorganische Substanzen wie in etwa Natrium, Calcium, Kalium, Chlorid, Magnesium, aber auch organische wie Proteine, Glucose, Aminosäuren, Lactat, Vitamin C (Silbernagel und Despopoulos 2007).

Mit der Ausscheidung geht auch die Regulation des Wassers und Elektrolythaushaltes einher, sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Des Weiteren ist die Niere ein hormonproduzierendes Organ, somit besitzt sie endokrine Eigenschaften (Fromm und Gäbel 2005).

Hormone sind Renin (wichtig für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), Erythropoietin (Regelt die Erythropoese), Calcitriol (Biologisch aktive Form des Vit. D3 und wichtig für den Kalzium Stoffwechsel) und Prostaglandine (zuständig für die Sekretion von Renin und die Durchblutung der Niere) (Kurz und Wagner 2017).

1.2 Chronische Niereninsuffizienz

Die weltweit steigende Anzahl an Fällen von chronischer Niereninsuffizienz (CKD), die damit verbundenen hohen Kosten und Mortalität (Levey et al. 2003) machen diese Krankheit besonders interessant für die Forschung. CKD kommt nicht nur bei Menschen häufig vor, sondern auch bei Hunden und vor allem Katzen. So erkrankt jede dritte Katze über 15 Jahren an CKD. Obwohl die Zahlen auf die gesamte Population an Katzen und Hunden bezogen, nicht besonders hoch sind, in Katzen 1-3 % und Hunde 0,5-1 %, steigt sie doch mit zunehmendem Alter. Fast 53 % der Katzen mit CKD sind älter als sieben Jahre und 10 % der Hunde erkranken ab einem Alter von über 15 Jahren an einer CKD (Kain und Pagitz 2017).

Da eine chronische Nierenerkrankung keine selbstständige Krankheit an sich ist, sondern lediglich den fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion beschreibt, gibt es mehrere Ursachen, die zu diesem Verlust führen können. In den meisten Fällen wird dies durch eine Beeinträchtigung einer oder gar beider Nieren, die sowohl strukturell oder funktionell oder beides sein kann, verursacht. Der Funktionsverlust ist meist irreversibel und progredient. Auch kann es bis zu einem totalen Verlust der physiologischen Funktion führen (Kain und Pagitz 2017).

Des Weiteren müssen die Schäden an der Niere über einen Zeitraum von mindesten drei Monaten bestehen, um von einer chronischen Niereninsuffizienz sprechen zu können (Levey et al. 2013).

Auch sind die Ursachen, die eine CKD auslösen nicht immer gleich und können in angeborene und erworbene Faktoren eingeteilt werden. Eine der häufigsten erworbenen Ursachen, die eine chronische Niereninsuffizienz bei Menschen auslöst, ist in Hocheinkommensländern Diabetes mellitus. Im Gegensatz dazu können Nierensteine eine CKD bei Hunden und Katzen auslösen, jedoch kaum bei Menschen (Kain und Pagitz 2017). Des Weiteren sind Hypertension, chronische Glomerulonephritis, chronische Pyelonephritis und polyzystische Nierenerkrankung allesamt Gründe, die zu einer CKD führen können. Auch kann der wiederholte Gebrauch von antiinflammatorischen Medikamenten zu einer chronischen Nierenerkrankung führen (Ammirati et al. 2020).

Weitere erworbene Ursachen können das Aufsteigen einer Infektion sein, die Aufnahme von nierentoxischen Substanzen, wie in etwa Polyethylenglykol (Kain und Pagitz 2017), sowie

eine schon bestehende Hypertension oder Proteinurie, aber auch akute Nierenerkrankungen (Chen et al. 2020).

Polycystic Kidney Disease, Renale Amyloidose, Erkrankung des glomerulären Apparates, Fanconis Syndrom und juvenile Nierendysplasie sind allesamt angeborenen Erkrankungen, die bei Haustieren zu Nierenerkrankungen führen können (Kain und Pagitz 2017). Auch beitragen können Autoimmunerkrankungen und angeborene Fehlbildungen der Nieren (Ammirati et al. 2020).

Zusätzlich spielen weitere Faktoren, wie Alter, Rasse und Impfstatus eine Rolle bei der Entstehung einer CKD in Haustieren (Chen et al. 2020).

1.2.1 Krankheitsbild der CKD

Leider sind die frühen Stadien einer CKD oft symptomlos oder gehen mit unspezifischen Symptomen einher. Die ersten wirklichen Veränderungen, die von den meisten Tierbesitzern wahrgenommen werden, sind Polyurie und Polydipsie. Im weiteren Verlauf kommen auch noch Anorexie und vermehrtes Erbrechen dazu, welches zu Gewichtsverlust führt. Weiters können noch andere Symptome auftreten, wie etwa Hypertension, Proteinurie, Anämie, eine metabolische Azidose und Hypokaliämie (Kain und Pagitz 2017). Da eine Hypertension sowohl auf Grund einer bestehenden CKD als Symptom auftreten kann, aber auch zu dieser beitragen kann, empfiehlt es sich diese regelmäßig zu kontrollieren, vor allem in älteren Patienten oder solche die schon an einer Niereninsuffizienz erkrankt sind. (Levey et al. 2003). Oft entsteht die Anämie in chronisch niereninsuffizienten Patienten durch einen Mangel an Erythropoetin zusammen mit einem Mangel an Eisen, Vitamin B12 und Folsäure. Zu einer metabolischen Azidose kommt es, wenn die glomeruläre Filtrationsrate unter einen Wert von 30 ml/min sinkt. Zusätzlich kann es zu einer Veränderung im Mineralstoffwechsel kommen, was zu Erkrankungen der Knochen führt (Ammirati et al. 2020).

Weitere Indikatoren für eine Schädigung der Niere sind Hämaturie, Leukozyturie, eine anhaltende Störung des Elektrolythaushaltes, sowie histopathologische Veränderungen bei einer Nierenbiopsie (Ammirati et al. 2020).

Oben genannte Pathologien können zu Verminderung der Anzahl an Nephronen führen. Da sich die Nephrone während der Schwangerschaftswochen 12-36 bilden, können über diesen Zeitpunkt hinaus keine neuen Nephrone mehr gebildet werden (Romagnani et al. 2017).

Kommt es zu einem Absinken der Gesamtanzahl an Nephrone, versuchen die restlichen Nephrone dies auszugleichen und zu kompensieren, um die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten. Dies führt jedoch zu einer zusätzlichen Schädigung was im weiteren Verlauf in einem totalen Verlust der Nierenfunktion resultieren kann.

Ab einem Verlust von zwei Drittel bis vier Fünftel aller Nephrone kommt es zusätzlich zu Veränderungen der Laborwerte und diese Vorgänge machen sich durch erste klinische Symptome bemerkbar (Kain und Pagitz 2017).

Um die verminderte Anzahl der Nephrone auszugleichen, kommt es in den verbliebenen Glomeruli zu einer erhöhten Filtration. Jedoch muss, um die glomeruläre Filtration zu erhöhen, es zu einer Erhöhung des Blutflusses, des Filtrationsdrucks und Volumens kommen, was wiederum zu weiteren Schäden führt. Mit fortschreitendem Verlust kommt es zu einer Proteinurie, wobei es bei der Rückresorption der Proteine zu Entzündungen im tubulointerstitiellen Raum kommt. Dies führt zu Vernarbungen der Tubuli. Anschließend produzieren Fibroblasten eine kollagene Matrix, welche die kleinen Blutgefäße und die noch intakten Tubuli zerstört und es dadurch zu tubulointerstitiellen Fibrosen kommt. Zum endgültigen Zelltod kommt es durch die Trennung von den noch vorhandenen Zellen von lokalen Faktoren, die für ihr Überleben wichtig sind (Kain und Pagitz 2017).

1.2.2 Nierenfibrose

Was letztendlich alle chronischen Nierenerkrankungen gemeinsam haben, ist die Entstehung von Fibrose in der Niere. Sie tragen maßgeblich durch ihre Verbindung mit einer Verminderung der Funktion des Nierenparenchyms zu der Entstehung des Endstadiums einer Nierenerkrankung bei, was zu eingeschränkter Funktion führt und letztendlich zum Organtod (Lovisa et al. 2015, Zhao et al. 2019).

Die Pathogenese der Nierenfibrosen findet meist auf zellulärer Ebene statt und besteht aus einem Zusammenspiel von mehreren Ereignissen, welches sehr komplex und vielschichtig ist. Zu diesem Zusammenspiel gehört einerseits die vermehrte Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten, eine damit einhergehende deutlich vermehrte Ablagerung von externer zellulärer Matrix, wie auch die Atrophie des tubulären Systems und Sklerosierung der

Glomeruli. Weiters kann ein gestörter Ablauf der Autophagie, welcher wichtig für die zelluläre Homöostase ist, Nierenfibrosen begünstigen (Zhao et al. 2019). Mit dem Verlust von Nephronen folgt eine unspezifische Wundheilungsreaktion, welche interstitielle Fibrose beinhaltet. Des Weiteren werden Fibrose und interstitielle Entzündungen durch die Sekretion von proinflammatorischen und profibrotischen Mediatoren gefördert. Diese Sekretion erfolgt vorwiegend durch das proximale tubuläre Epithel, welches bei infiltrierenden Immunzellen, Albuminurie und im Falle von Diabetes, Glukosurie aktiviert wird (Romagnani et al. 2017). Interstitielle Fibrose fördert die renale Ischämie, was zu weiteren Schädigungen der Nephronen führt (Romagnani et al. 2017).

Zu der oben schon erwähnten Ablagerung von extrazellulärer Matrix kommt es durch eine vermehrte Anreicherung von Myofibroblasten im Interstitium (Grande et al. 2015). Dadurch kommt es im weiteren Verlauf zu einer Narbenbildung (Zhou et al. 2016). Vermutet wird, dass nach einer Verletzung die Zellen der Nierentubuli eine Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) durchlaufen (Zhou et al. 2016), welche der Ursprung der Myofibroblasten ist (Grande et al. 2015). Der Vorgang der EMT hat einen negativen Einfluss auf die Reparatur- und Regenerierfähigkeit der Tubuli, hierdurch wird ein Zellzyklus-Stillstand induziert, was wiederum vermehrt interstitielle Fibroblasten begünstigt (Zhou et al. 2016). Jedoch können die noch verbliebenen Nephronen durch das gebildete Narbengewebe mechanisch stabilisiert werden (Romagnani et al. 2017).

1.3 Mäuse

Im Laufe der Jahre hat sich das Mausmodell zum bevorzugten Modell unter den Modellen der Säugetiere entwickelt (Vanhooren und Libert 2012). Ausschlaggebend ist, dass sich das menschliche Genom zu 99 % mit dem Genom der Mäuse deckt, was es zu einem geeigneten Modell für Studien und Versuche macht (Vandamme 2014). So sind sie nicht nur auf physiologischer Ebene ähnlich, sondern auch auf zellulärer. Vor allem sind sich das immunologische- wie auch das hormonelle System sehr ähnlich, auch weist die Anatomie einen ähnlichen Aufbau vor (Vanhooren und Libert 2012).

Ein entscheidender weiterer Vorteil gegenüber anderen Versuchstieren ist, dass Mäuse dank ihrer geringen Größe statistisch ausreichend dimensionierte Studien zulassen und dabei sehr kostensparend sind (Vandamme 2014).

Um die genetischen Faktoren zu untersuchen, werden in der Forschung sehr gerne Inzuchtstämme verwendet (Usami et al. 2018). Um einen Inzuchtstamm zu etablieren, werden immer Tiere desselben Wurfes über 20 oder mehr Generationen verpaart.

Einer der bekanntesten Inzuchtstämme ist jener der C57BL/6 Mäuse. Sie entstanden in den 1930er Jahren aus den von C.C.Little gezüchteten C57BL Mäusen. Später teilte sich dieser Mäusestamm noch einmal, in den C57BL/6J aus dem The Jackson Laboratory und C57BL/6N, welcher im National Institute of Health entwickelt wurde. Wobei diese Stämme sogenannte Substämme darstellen, welche sich genetisch vom ursprünglichen Ausgangsstamm unterscheiden (Mekada et al. 2009).

Der C57BL/6J Stamm zählt heute zum Goldstandard und war der erste Mäusestamm, dessen Genomsequenz veröffentlicht wurde (Ahlgren et al. 2019).

Weiters eignen sich Mäuse deutlich besser als Ratten für Versuche zu chronischen Nierenerkrankungen, da sich Mäuse leichter genetisch modifizieren lassen.

Viele Knockout Tiere gehen auf C57BL/6 Mäuse zurück, daher ist die Entwicklung eines Modells der CKD für diese Tiere von Vorteil und würde schon existierende Knockout Stämme für Versuche in Frage kommen lassen (Mohammed-Ali et al. 2014).

1.4 CKD-Modelle

Um CKD genauer zu erforschen, stellen Tiermodelle eine sehr gute Möglichkeit dar. Mit ihnen lassen sich nicht nur Pathogenesen und krankheitsspezifische Mechanismen untersuchen, sondern sie bieten auch die Möglichkeiten verschiedene Elemente der humanen CKD widerzuspiegeln. Des Weiteren kann man anhand der Tiermodelle neue potenzielle Therapieansätze erforschen.

Jedoch sind nicht alle Modelle gleich und je nachdem ob Ratten oder Mäuse verwendet werden, welcher Stamm, welches Geschlecht und Alter sind Kriterien, welche in der Wahl des richtigen Modells berücksichtigt werden müssen.

Die größte Übergruppe, wie sich die Modelle einteilen und unterscheiden lassen ist, ob ein in-vitro Model oder ein in-vivo Model verwendet wird.

In vitro Modelle sind insoweit eingeschränkt, als dass sie nur für den untersuchten Zelltyp gelten und nicht die Übertragbarkeit von der Zelle auf den Organismus wiedergeben. Sie können jedoch zur Bewertung von Signalwegen und zellspezifischen Vorgängen verwendet werden (Yang et al. 2010).

Im Bereich der in vivo Modelle gibt es nach Yang et al. 2010 mehrere Möglichkeiten, welche wiederum in drei Gruppen eingeteilt werden können. Die Spontanen Modelle zu denen Spontane Hypertensive Ratten, Buffalo/mna Ratten und Munich Wistar Frömter Ratten zählen, genetisch veränderte Modelle wie in etwa Alport-Syndrom Modelle und die erworbenen Modelle zu denen die 5/6 Nephrektomie aber auch Unilaterale urethrale Obstruktion, Folsäure Nephropathie, Cyclosporin A Nephropathie und DOCA-Salz Nephropathie und die durch Toxine induzierten Cisplatin und Aristolochia Acid Modelle zählen. Folgend werden die genannten Modelle genauer beschrieben.

- Spontane Hypertensive Ratten (SHR) als Modell für Hypertension:

Um die Hypertension des Menschen zu simulieren, ist das SHR ein bevorzugtes Modell. Jedoch muss hier besonders darauf geachtet werden, ob männliche oder weibliche Tiere verwendet werden. Bei Männchen kommt es zu einer Proteinurie ab der sechsten Lebenswoche, die dann weiter ansteigt. Weibliche Ratten erreichen zwischen der sechsten und achten Woche ein Plateau, welches sich bis zur 14. Woche stabilisiert. Was die GFR betrifft, gibt es bei den Weibchen keinen nennenswerten Bezug zu ihrem Alter (Yang et al. 2010).

- Buffalo/mna Ratte

Buffalo Ratten eignen sich, um das idiopathische nephrotische Syndrom zu erforschen, da es zu einer spontanen Veränderung der Podozyten kommt. Im weiteren Verlauf zeigen diese Tiere eine Proteinurie und es kommt zu einer Sklerose der *Glomeruli*, wobei in einem Alter von 22 Monaten 40 % der *Glomeruli* betroffen sind. Mit sechs Monaten können Läsionen entstehen, die vergleichbar mit der Humanen fokalen und segmentalen Glomerulosklerose sind (Yang et al. 2010).

- Munich Wistar Frömter (MWF) Ratten

Diese Ratten haben eine verminderte Nephronenanzahl, welche angeboren ist, und um bis zu 30-50 % verringert ist. Dieses genetische Modell bietet sich an, um dieselbe angeborene Verminderung der Nephronen in Menschen zu studieren, welche zu Hypertension und Salz Sensibilität im Alter führen kann. MWF Ratten entwickeln im Alter von zehn Wochen eine Proteinurie und bis zum neunten Monat signifikante Glomerulosklerosen. Auch hier sollten eher männliche Tiere verwendet werden (Yang et al. 2010).

- Alport Syndrom

In diesem Modell wird eine COL4A3-Gen-Knockout-Maus verwendet, da es durch eine Mutation an den Typ-IV_Kollagenen-Genen zu einer erblichen Glomerulopathie, dem Alport-Syndrom, kommt. Dieses Syndrom zeichnet sich durch Nierenversagen, Hämaturie und Hörverlust aus. Im Alter von 2-3 Monaten entwickeln diese Mäuse eine Proteinurie, im Alter von 3-4 Monaten kommt es zu einem Nierenversagen, an dem sie letztendlich versterben (Bao et al. 2018).

- 5/6 Nephrektomie

Eine 5/6 Nephrektomie simuliert den Prozess eines Nierenversagens aufgrund des Verlustes von Nierenmasse. Es gibt zwei Arten, wie man dieses Modell umsetzen kann, wobei erstere Methode nur bei Ratten gut anwendbar ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im ersten Ansatz eine Niere entfernt wird und die Arterien der im Körper verbliebenen Niere ligiert werden. Bei der zweiten Methode wird ebenfalls eine Niere entfernt und ein bis zwei Wochen danach bei der verbliebenen Niere die Nierenpole entfernt. Mit dieser Methode ist in der akuten Phase eine glomeruläre Hypertrophie zu beobachten und mit zunehmendem Verlauf entwickeln sich Glomerulosklerosen, sowie intestinale Fibrosen und tubuläre Atrophien. In Woche zwölf sind Glomerulosklerosen und tubulointestinale Fibrosen sehr verbreitet (Yang et al. 2010).

- Unilaterale ureterale Obstruction (UUO)

Eine UUO kann sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen gemacht werden und ist nicht von einem Stamm abhängig. Es wird zur Untersuchung der Mechanismen der tubulointestinalen Fibrose verwendet. Auch kann sowohl eine komplette UUO als auch eine partielle oder rückgängig machbare UUO durchgeführt werden, wobei letztere technisch weitaus komplexer und aufwändiger ist und nicht immer zum gewünschten Ziel führt. Eine komplette UUO führt innerhalb von 24 Stunden zu einer Verminderung des renalen Blutflusses und der GFR. Anschließend kommt es zu interstitiellen Entzündungen, Atrophie der Tubuli und Fibrosen. Die betroffene Niere erreicht ein End-Stage Stadium innerhalb der zweiten Woche. Zu beachten ist in diesem Modell, dass es weder zu einer Proteinurie, einem Anstieg des Serumkreatinin-Spiegels oder Hypertension kommt (Yang et al. 2010).

- Folsäure Nephropathie

Hier kommt es zu interstitiellen Fibrosen, wobei es durch die Bildung von Folsäurekristallen in der akuten Phase zu tubulären Nekrosen und in der chronischen zu interstitiellen Fibrosen kommt. Mit einer gleichzeitigen Gabe von Natriumbikarbonat kann versucht werden, den Urin zu alkalisieren und somit die Kristallbildung zu verhindern. Der Vorteil gegenüber der UUO ist, dass in diesem Modell auch die Nierenfunktion gemessen werden kann (Yang et al. 2010).

- Cyclosporin A Nephropathie

Cyclosporin A (CyA) kann bei längerer Gabe zu Nierenfibrosen führen. Bei einer Gabe von CyA und gleichzeitig salzarmer Fütterung kommt es bei Ratten zu einem Anstieg des Serumkreatinins und des BUN sowie zu einem Sinken der GFR. Zusätzlich kommt es zu Fibrosen, Atrophien und Gefäßveränderung der Niere (Yang et al. 2010).

- DOCA-salt Nephropathie

Verabreicht man Deoxycorticosteron Acetat (DOCA) gleichzeitig mit einer unilateralen Nephrektomie und einer hohen Salz Fütterung, kommt es zu schwerer Hypertension, Nierenschäden und niedrigem Renin Spiegel. Auch kann eine Kombination aus Nephrektomie und zusätzlicher Gabe von Angiotensin II angewendet werden, um eine fortschreitende Nierenschädigung zu bekommen. Im Verlauf kommt es hier zu Proteinurie und Glomerulosklerose (Yang et al. 2010).

- Cisplatin Modell

Cisplatin wird zur Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt und ist eine Chemotherapeutikum. Bei Menschen kann es durch hohe Dosierungen zu akuten Nierenversagen (AKI) kommen. Bei Nagetieren reicht schon eine einzige Dosis von 6-20mg/kg i.p aus, um zu einer AKI zu führen (Bao et al. 2018).

- Aristolochia acid Modell

Ist ein Modell, um den Übergang von AKI in CKD zu studieren. Hierbei wird über einen Zeitraum von 5 Tagen jeweils 5mg/kg/d Aristolochia acid injiziert, worauf hin es zu proximalen tubulären Zellschäden, Nekrosen und Nierenfibrose kommt (Bao et al. 2018).

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den geltenden EU- und nationalen Richtlinien für die Pflege und das Wohlergehen von Tieren durchgeführt. Alle Tierversuche wurden von den Ethikkommissionen der Veterinärmedizinischen Universität Wien und des österreichischen Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWF-68.205/0054-II/3b/2013).

Männliche C57BL/6N-Mäuse wurden mit einem Standard-Mausfutter (Normaldiät, ND) (Sniff™) aufgezogen, das 1 % Kalzium und 0,7 % Phosphor enthielt, und wurden mindestens zwei Wochen vor dem Eingriff auf eine kalzium- und phosphatreiche Diät (CPD) mit 2,0 % Kalzium, 1,25 % Phosphor und 20 % Laktose umgestellt. Sowohl die CPD als auch die ND hatten den gleichen Energiegehalt (14 MJ/kg) und die gleiche Nährstoffverteilung (Kohlenhydrate, Eiweiß, Fett).

Für die Dauer der Versuche wurden alle Tiere in 2er-Paaren bei 22-24 °C und einem 12-Stunden-Licht-/12-Stunden-Dunkel-Zyklus mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Vor der Nekropsie wurde der Urin über Nacht in Stoffwechselkäfigen gesammelt.

2.2 Operation

In diesem Versuch wurden 62 C57BL/6N Mäuse verwendet. Um die chronische Niereninsuffizienz zu simulieren, wurden an 32 Mäusen eine 5/6 Nephrektomie durchgeführt, bezeichnet als Nx Mäuse. Als Kontrolle dienten 30 Mäuse, die zum Schein operiert wurden und im weiteren Verlauf als SH Mäuse betitelt werden.

Anästhesiert wurden die Tiere intraperitoneal mit 17 mg/kg Ketamin und 0,08 mg/kg Medetomidin, die Erhaltung erfolgte mit Isofluran (2%ig). Zusätzlich bekamen sie eine Schmerzabdeckung vor der Operation mit je 50 µl/10g Metamizol und Buprenorphin *subcutan*. Weiters bekamen sie bis Tag drei postoperativ (post OP) täglich Metamizol zur Schmerzabdeckung und bei Bedarf Buprenorphin. Um die postoperative Genesung zu optimieren, wurden die Mäuse auf Heizmatten gehalten und ihr Zustand täglich beurteilt.

Initial wurde an der linken Niere eine 2/3 Nephrektomie durchgeführt. Dafür wurde die linke Flanke eröffnet und unter Verwendung eines chirurgischen Mikroskops die Nierenkapsel entfernt, um eine Schädigung des Ureters zu verhindern. Die beiden Nierenpole wurden entfernt, während gleichzeitig die Nierenarterie und Vene abgeklemmt wurden für maximal 90 Sekunden, um einen Blutverlust und einen akuten Nierenschaden zu verhindern (Abbildung 2). Zusätzlich wurden die verbliebene Niere an den beiden operierten Polen mit einem Elektro kauter gekautert (Abbildung 3) und eine hämostatische Kollagen-Membran verwendet (Gelaspon, Chauvin Ankerpharm, Berlin, Germany). Die komplette rechte Niere wurde eine Woche nach der ersten Operation entfernt. Das entfernte Nierengewebe wurde gewogen, um eine korrekte 5/6 Nephrektomie zu gewährleisten (Abbildung 5).

Die Sham Operationen wurden genauso wie die Nx Mäuse auf zwei Mal durchgeführt, wobei die jeweiligen Nieren freigelegt und anschließend repositioniert wurden. Hautschnitte wurden mit Einzelknopfnähten verschlossen.

Um das Fortschreiten der CKD zu beurteilen, wurden 10-12 Mäuse pro Gruppe 4, 8 und 12 Wochen nach der Operation getötet.



Abbildung 1: Bereits anästhesierte Maus, der Flankenbereich ist rasiert und bereit für die 2/3 Nephrektomie



Abbildung 2: Der craniale Nierenpol der linken Niere wurde hier bereits entfernt. Zusätzlich ist die Arterienklemme zu sehen, welche vorübergehend die Blutzufuhr stoppt.



Abbildung 3: Nach Entfernung des zweiten Nierenpols der linken Niere werden beide Enden gekautert.



Abbildung 4: Fertige 2/3 nephrektomierte Niere (links).



Abbildung 5: Nach zwei Wochen wird die zweite (rechte) Niere komplett entfernt.

2.3 Organ Fixierung und Einbettung

Nach der Euthanasie wurden die Nieren für 24 h bei 4 °C in 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) auf einem Magnetrührer fixiert (gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4). Dann werden sie abermals bei 4 °C für 24 h ausgewaschen in 0,1 M Phosphat-Puffer mit 10%iger Sucrose. Anschließend in 70%ig Alkohol zur Langzeitlagerung.

Die verwendeten Nieren kamen anschließend in eine Histokinette (Histocom/Thermo; Gewebereinbettungsautomat Excelsior 100). Dort wurden sie infiltriert. Dies geschieht über 24 Stunden und in einer aufsteigenden Reihenfolge des Alkoholgehaltes. 75%-90%-95% dann dreimal in Isopropanol und abschließend dreimal in Xylol. Am Ende dann dreimal in Paraffin bei 50 °C.

Anschließend kamen die infiltrierten Nieren zur Einbettstation (Bavimed Laborgeräte GmbH), wo sie in Paraffinblöcke eingebettet wurden. Dies geschieht in dem die Organe, welche sich in Kassetten befinden, in Metallschälchen mit flüssigem Paraffin (50 °C) überschichtet werden, und anschließend zum Aushärten auf eine Eisplatte gestellt werden.

2.4 Schneiden

Geschnitten wurden die Paraffinblöcke an einem Rotationsmikrotom (Histocom/Thermo; HM 355 S Rotationsmikrotom) mit Cool Cut (Histocom; Histocom Medizintechnik). Zuerst wurde mit 10 µm getrimmt und anschließend 32 Schnitte mit 5 µm genommen. Die Organschnitte wurden sofort in ein Kaltwasserbecken (Medax; MEDAX WB24 Paraffinstreckbad für Mikrotom Wasserbad, Ölbad) gelegt und anschließend in ein Warmwasserbecken (Lauda; Lauda Ecoline E111 Wärmethermostaat) für ca. 10 min. Nach dem sie sich im Warmwasserbecken gestreckt haben, werden jeweils zwei Schnitte auf einen mit APES vorbehandelten Objektträger aufgezogen. Dies macht man, um eine Erhöhung der Haftung zwischen Paraffinschnitt und Glasoberfläche zu erreichen.

Insgesamt ergab das bei 32 Schnitten 16 Objektträger. Anschließend kamen sie zum Trocknen für 24 h in einen Inkubator (Heraeus; Umluft-Trockenschrank Function Line UT12 Hereaus).

APES:

Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Objektträger (OT) werden in Glas-Färbegestelle fächerartig eingeordnet.

Vorgehensweise:

Aceton I	10 min.
Leitungswasser	Spülen
Aceton II	5 min.
APES-Lösung	5 min.
Aqua dest.	Spülen
Aqua dest	5-10 min. abspülen
Lufttrocknen oder Trocknung der OT	Bei ca. 40-50°C im Umluft-Wärmeschrank

APES-Lösung:

3-Aminopropyl-triethoxy-silane (Sigma-Nr. A 3648)	5 ml ad
Aceton	200 ml

2.5 Färben

2.5.1 H&E-Färbung von Paraffinschnitten

Durch Extraktionsprozesse aus dem Blauholz wird Haematoxylin gewonnen (verwendet bei Hämalan nach Mayer). Anschließend wird durch Oxidation die negative Ladung des Extraktes (Hämtein) verstärkt. Es kommt durch Bindung an Alaune und Metalle zu einer Umladung, wodurch sich das Hämalan an die negativ geladenen Nukleinsäuren des Zellkerns lagert. Um die blaue Farbe zu erhalten, muss der pH-Wert bei über drei sein, was durch Leitungswasser erzielt wird.

Die Färbung des Zytoplasmas erreicht man mittels Eosins (0,5-2 %). Es färbt die positiv geladenen Proteine des Plasmas und plasmatische Strukturen rot, was durch ein Tropfen Eisessig noch verstärkt werden kann.

Ziel der Zytoplasmafärbung ist es, einen Kontrast zur Kernfärbung zu bekommen.

Vorgehen:

Zuerst wurden die OT entparaffiniert, was mit einer absteigende Alkoholreihe durchgeführt wurde. Danach Färben mit Hämatoxylin (nach Mayer) und 1 % wässrigem Eosin gelblich.

Entparaffinieren:

Xvlol I	15 min.
Xylol II	15 min.
Isopropanol	5 min.
70% EtOH	5 min.
40% EtOH	5 min.
Aqua dest.	5 min.

Färbung:

Hämatoxylin (Mayer)	3-4 min.
fließendes Leitungswasser	10 min.
1% wässriges Eosin gelblich (auf 200 ml 2 Tropfen Eisessig zugeben!!!)	2-5 min.
70% EtOH	2-3 x dippen
96% EtOH	3 min.
Isopropanol	5 min.
Xylol	5 min.

Eindecken:

Mit DePeX

Hämatoxylin nach Mayer (Hämalaun):

Hämatoxylin	1 g	in
Aqua dest.	1.000 ml	lösen, dann
Natrium-Jodat (NaJO ₃)	0,2 g	und
Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat x 12 H ₂ O)	50 g	hinzu und gut rühren, dann
Chloralhydrat (zur Konservierung, Lsg. blau-violett)	50 g	dann
Zitronensäure (Lsg, färbt sich rötlich- violett)	1 g	zugeben.

1% wässriges Eosin gelblich:	
Eosin gelblich	10 g
Aqua dest.	1000 ml

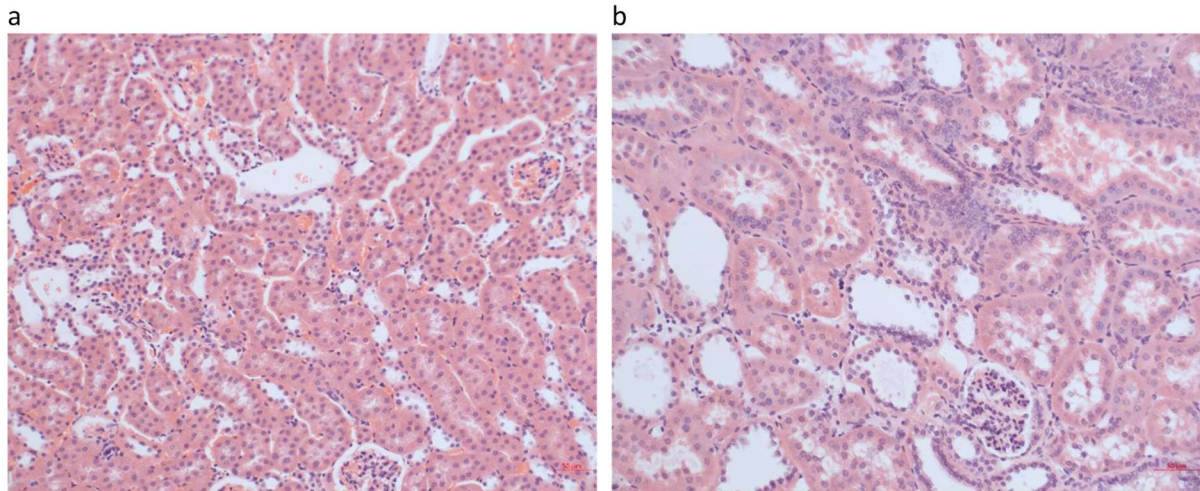


Abbildung 6: Histologische Darstellung der Niere (Originalvergrößerung 200fach, HE-Färbung). Bild (a) zeigt ein SHAM Tier, Bild (b) ein Nx-Tier, jeweils 12 Wochen post op.

2.5.2 PIKRO-SIRIUSROT-Färbung

Diese Färbung wird speziell verwendet, um Kollagenfasern darzustellen. Es ist eine polarisationsoptische Methode, was bedeutet, dass die Doppelbrechung der Kollagenfasern im entsprechenden Licht durch den Farbstoff Siriusrot verstärkt wird. Das kräftige Rot wird durch die straffe und einheitliche Ausrichtung der Kollagenfasern erreicht. Es werden Färbungen im Bereich zwischen Grün und karminrot erreicht, je nach Anlagerung des Farbstoffes.

Vorgehen:

Wie bei der HE-Färbung wurde auch hier mit einer absteigenden Alkoholreihe eine Entparaffinierung erreicht. Anschließend Färben der Nieren mit Pikro-Siriusrot Solution für 90 min. Waschen der OT und Eindecken mittels DePeX und Abdecken der fertigen Objektträger mit Alufolie, um eine Verfärbung zu verhindern.

Entparaffinieren:

Xylol I	15 min.
Xylol II	15 min.
Isopropanol	5 min.
70% EtOH	5 min.
40% EtOH	5 min.
dH ₂ O	2,5 min.
dH ₂ O	2,5 min.

Färbung:

mit Picro-sirius_Red Solution: Niere 90 min (lichtgeschützt)

Waschschritte:

Acidified Water I	3 min. (lichtgeschützt!)
Acidified Water II	3 min. (lichtgeschützt!)
Isopropanol I	3 min.
Isopropanol II	3 min.
Xylol I	7 min.
Xylol II	7 min.

Eindecken:

mit DePeX

mit Alufolio abdecken

Picro-Sirius-Red Solution:

Sirius Red F3B	0,5 g
Pikrinsäure-Solution 1,3%	500 ml

Acidified Water:

Konzentrierte HCL (37%)	0,83 ml
dH ₂ O	1 L

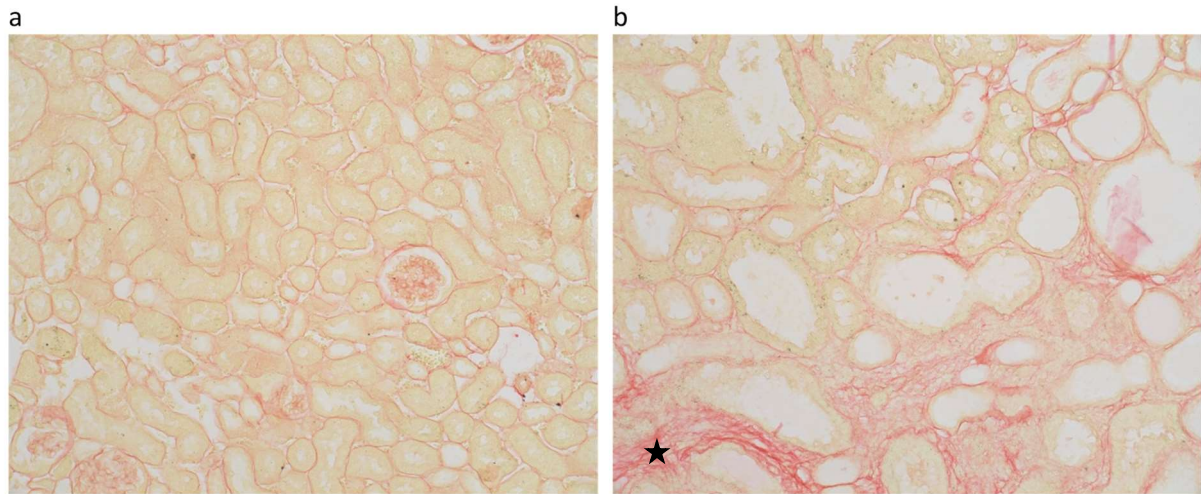


Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der Niere (Originalvergrößerung 200fach, Färbung **Pikro-Siriusrot**) nach **12 Wochen**, wobei Bild (a) eine Sham Niere zeigt und Bild (b) eine Nx-Niere. Der mit Stern markierte Bereich zeigt eine deutliche Anhäufung von Kollagen.

2.6 Auswertung

Histologische Auswertung:

Die Fibrose wurde mittels ImageJ anhand von PSR-gefärbten Schnitten ausgewertet.

Statistische Auswertung:

Die statistische Analyse wurde mit dem GaphPad Prism Version 9 gemacht, wobei eine Two-way ANOVA ausgeführt wurde mit den Faktoren Zeit und Operation und auch die Interaktion zwischen diesen Faktoren analysiert wurde. Zusätzlich wurde ein multiple unpaired-t-Test für die Vergleiche zwischen den einzelnen SH und Nx Gruppen in bestimmten Wochen gemacht. P-Werte wurden ab $<0,05$ als signifikant eingestuft und alle Ergebnisse werden in den Grafiken und Tabellen mit Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben.

3 Ergebnisse

In diesem Versuch wollten wir zeigen, ob es bei unserer Art der 5/6 Nephrektomie zu Veränderungen, insbesondere einer vermehrten Fibrosierung, in der Niere kommt. Weiters wurde der Versuch über einen Zeitrahmen von 12 Wochen durchgeführt. Damit wollten wir wiederum feststellen, ob es einen signifikanten Unterschied gibt, was den Zeitverlauf betrifft. Hierfür wurden sowohl scheinoperierte als auch Nx Mäuse jeweils in Woche vier, acht und zwölf post-OP euthanasiert und die Nieren anschließend beurteilt.

3.1 Fibrose

Betrachtet man die Daten (Tab. 1) und die Two-way ANOVA (Abb. 8a), so kann man erkennen, dass es einen signifikanten Unterschied gibt, ob die Mäuse operiert wurden oder nur schein-operiert. Hierbei liegt der p-Wert $< 0,0001$ und ist somit signifikant bei einem Alpha von 0,05. Somit muss die Null-Hypothese abgelehnt werden.

Betrachtet man die Mäuse der Woche vier operiert zu scheinoperiert, sieht man noch keinen Unterschied, da hier der p-Wert bei 0,2397 liegt. Aber in Woche acht ist schon ein Unterschied zwischen operiert zu scheinoperiert sichtbar mit einem p-Wert von $< 0,0001$. Dasselbe gilt auch für die Mäuse der Woche zwölf mit demselben p-Wert.

Aus dieser statistischen Analyse geht hervor, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen scheinoperierten und 5/6-nephrektomierten Mäusen in der Ausbildung von Nierenfibrose besteht.

Der Einfluss der Zeit zeigt in diesem Modell auf alle Mäuse bezogen, also sowohl Nx als auch Sham, keine statistische Signifikanz, mit einem p-Wert von 0,1308. Sieht man sich jedoch nur die Nx Gruppe an, so zeigt sich im Verlauf der zwölf Wochen post-OP ein signifikanter Unterschied bei der Ausbildung von Fibrose. Dies ist anhand der Gruppe 4 Wochen Nx versus 12 Wochen Nx mit einem p-Wert von 0,0016 ersichtlich.

Die Interaktion von Zeit und Operation zeigt hinsichtlich der Statistik eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0011.

Tabelle 1: Auswertung der Nierenschnitte der einzelnen Mäuse von Woche 4 – 12, jeweils mit p-Wert (t-Test) des Vergleiches jeder Woche zwischen SH und NX, Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD).

	Woche 4		Woche 8		Woche 12	
	SH	NX	SH	NX	SH	NX
	0,25	0,67	0,30	0,62	0,35	0,40
	0,39	0,23	0,15	0,75	0,12	0,80
	0,15	0,55	0,13	0,94	0,19	1,47
	0,46	0,42	0,05	1,22	0,14	1,04
	0,30	0,89	0,17	0,56	0,14	0,38
	0,23	0,78	0,27	0,37	0,28	1,43
	0,19	0,25	0,14	0,61	0,14	0,69
	0,41	0,48	0,07	0,87	0,25	1,02
	0,24	0,51	0,15	0,72	0,11	0,70
	0,53	0,51	0,16	0,47	0,10	1,23
						0,89
						0,86
p-Wert	0,2397		<0,0001		<0,0001	
Mean	0,315	0,159	0,182	0,529	0,713	0,909
SD	0,125	0,077	0,084	0,209	0,248	0,352

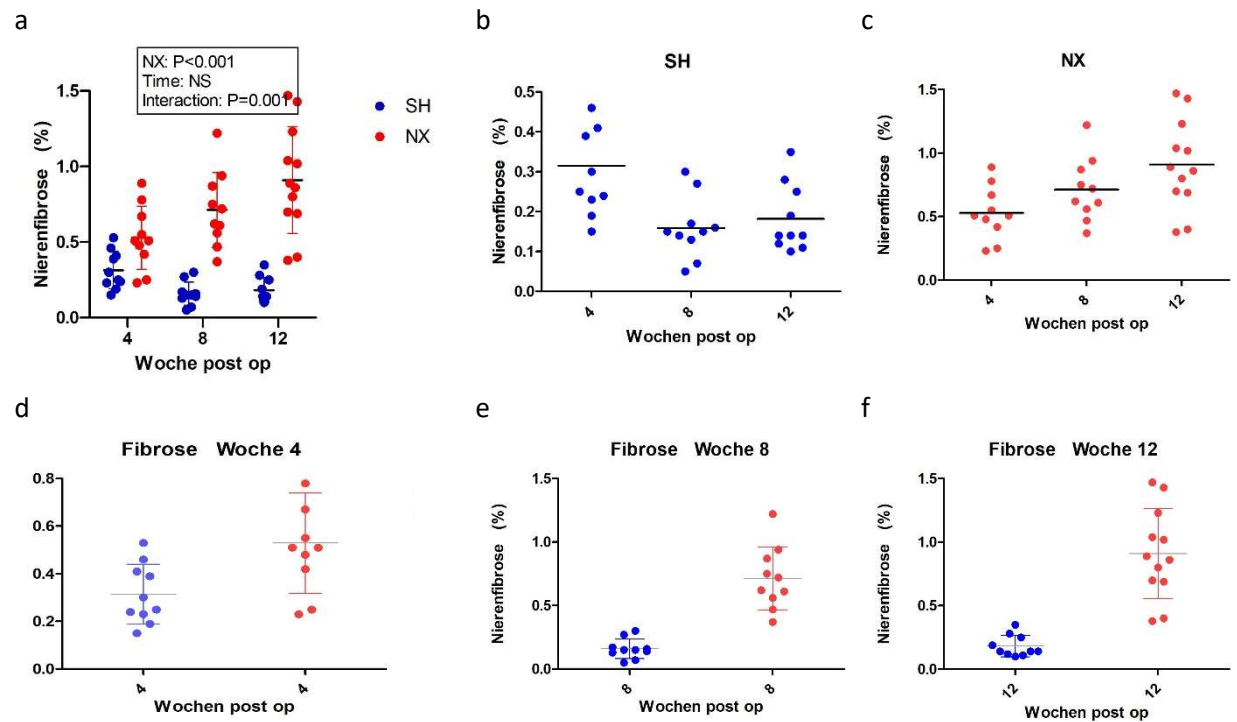


Abbildung 8: Bild (a) zeigt den Grad der Nierenfibrose aller 62 Mäuse zueinander in den **zwölf Wochen**. Blau sind die SH Mäuse und rot die Nx Mäuse. (b) zeigt den Verlauf der Nierenfibrose innerhalb der zwölf Wochen der SH Mäuse zueinander an, (c) den Verlauf der Nierenfibrose innerhalb der zwölf Wochen aller Nx Mäuse zueinander, (d) vergleicht den Prozentsatz der Nierenfibrose der SH (blau) zu Nx (rot)Mäusen in der Woche vier post Op, (e) vergleicht den Prozentsatz der Nierenfibrose der SH und Nx Mäuse der Woche acht zu einander und (f) vergleicht den Prozentsatz der Nierenfibrose der SH Mäuse der Woche zwölf zu den Nx Tiere der Woche zwölf. Die Daten wurden mittels two-way ANOVA und anschließend unpaired-t-Test analysiert. Ergebnisse werden mit Mittelwert $\pm$ SD angegeben.

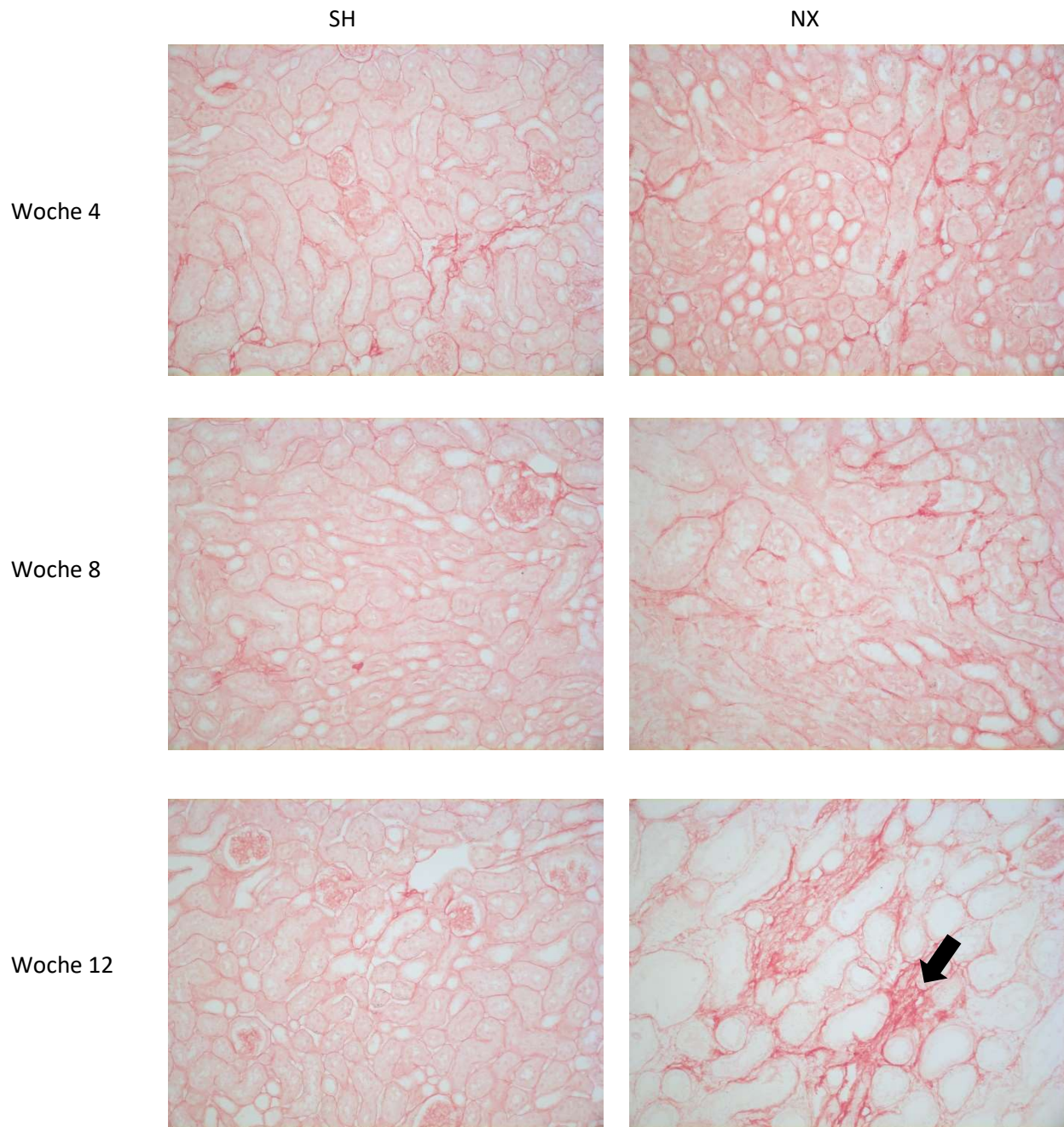


Abbildung 9: Paraffinschnitte der Niere (Originalvergrößerung 200fach) mit **PSR** gefärbt, jeweils in **Woche vier, acht und zwölf** post Op, wobei SH die scheinputierten Tier sind und Nx die Mäuse die eine 5/6 Nephrektomie bekommen haben. In den Nx Tieren ist eine deutliche Zunahme der Nierenfibrose über die Zeit zu sehen (mit Pfeil markiert).

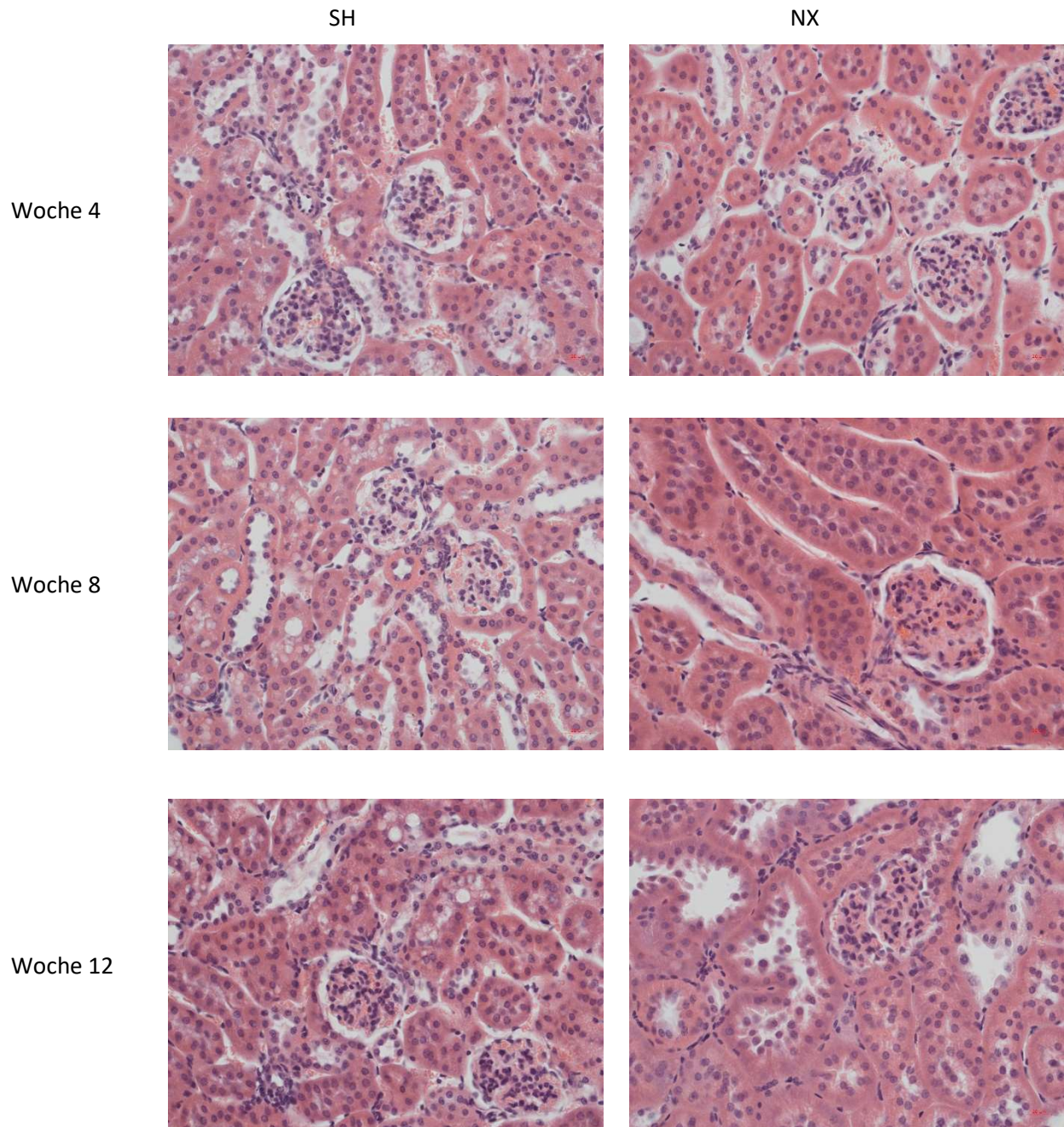


Abbildung 10: Paraffinschnitte der Niere (Originalvergrößerung 400fach) mit **HE** gefärbt, jeweils in **Woche vier, acht und zwölf** post Op, hier ebenfalls die scheinputierten Tier als SH beschriftet und mit Nx Beschriftung jene Mäuse die eine 5/6 Nephrektomie bekommen haben.

4 Diskussion

Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, wie sich eine 5/6 Nephrektomie bei C57BL/6 Mäusen auswirkt, hinsichtlich der Bildung von Nierenfibrose. Mit einer 5/6 Nephrektomie wird eine chronische Niereninsuffizienz simuliert. Um Vergleichswerte zu bekommen, wurden 32 Mäuse 5/6-nephrektomiert und 30 Mäuse scheinoperiert. Der Verlauf wurde dann über zwölf Wochen gemessen.

Es stellt sich heraus, dass die Mäuse, die 5/6-nephrektomiert wurden, eine Nierenfibrose ausbilden, dass die Zeit, bezogen auf alle Mäuse, jedoch keinen signifikanten Unterschied ergibt. Im Vergleich der einzelnen Wochen ist jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ab Woche 8 ersichtlich. Hewitson et al. 2009 geben in ihrem Review über verschiedene Kleintiermodelle für Nierenerkrankungen an, dass tubulointerstitielle Fibrosen und Glomerulosklerosen die vorherrschenden pathologischen Veränderungen sind. Weiters deckt sich die Ausbildung von Fibrose mit den Ergebnissen einer Studie von Hamzaoui et al. 2020, in der sowohl C57BL/6-Mäuse als auch 129Sv-Mäuse einer 5/6 Nephrektomie unterzogen wurden. Jedoch wurde nicht nur analysiert, ob die Mäuse eine CKD entwickeln, sondern auch im Verhältnis zueinander, wie stark diese ausgeprägt ist. Anhand der Ergebnisse dieser Studie stellte sich heraus, dass die C57BL/6 Mäuse zwar Nierenschäden entwickeln, welche sich in der Bildung von Glomerulosklerosen, tubulären Schäden, interstitiellen Fibrosen und Verdickungen der Gefäße erkennen lässt, jedoch alle Schäden signifikant geringer waren verglichen mit den 129Sv-Mäusen (Hamzaoui et al. 2020).

Diese Aussage konnte in unsere Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden, da in unserem Versuch geschaut wurde, ob die 5/6-nephrektomierten Mäuse überhaupt Nierenfibrose entwickeln im Vergleich zu den Sham-Tieren und daher kann nicht gesagt werden, wie stark hier die Ausprägung im Vergleich zu anderen Modellen oder Mäusestämmen ist. Eine mögliche Ursache weshalb C57BL/6 niedrigere Werte und somit eine geringere CKD entwickeln, könnte sein, dass sie im Vergleich zu anderen Stämmen nur ein Renin-Gen besitzen sowie ein geringer ausgeprägtes Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS). Bei Mäusen, die nur ein Renin-Gen besitzen, kommt es dazu, dass die Aktivität von Renin von Geburt an um ein zehnfaches niedriger ist als bei jenen Mäusen die zwei Renin-Gene haben (Rabe und Schaefer 2016.). Um das fehlende Renin-Gen außer Acht zu lassen, empfiehlt Rabe und Schaefer in ihrer Arbeit, dass den Versuchstieren kontinuierlich Angiotensin-II verabreicht wird.

Als von Rabe und Schaefer 2016 als weitere zur Simulation von CKD angeführte Methode, ist die UUO (Unilateral Ureteral Obstruction) zu erwähnen. Hierbei wird ein Ureter ligiert, was zu einer Hydronephrose, Zelltod und tubulointerstitieller Fibrose führt (Rabe und Schaefer 2016). Laut Yang et al. 2010 wird für dieses Modell kein spezifischer Mäusestamm empfohlen, nach Rabe und Schaefer eignet sie sich besonders bei der Verwendung von C57BL/6 Mäusen.

Eine weitere Methode, die angeführt wird (Yang et al. 2010) ist die DOCA-Salz Nephropathie. Dieses Modell inkludiert eine unilaterale Nephrektomie, dazu die wöchentliche Verabreichung von Deoxycorticosteron Acetat (DOCA) subkutan und zusätzlich eine hohe Gabe von Salz über das Trinkwasser. Dieses Modell soll zu einer Hypertension und somit einer CKD in Mäusen führen, was auch Leelahavanichkul et al. 2010 empfiehlt, da laut ihrer Studie erst eine Hypertension dazu führt, dass C57BL/6 Mäuse eine CKD entwickeln. In Bezug auf die 5/6 Nephrektomie gibt jedoch Hewitson et al. an, dass es bei dieser Methode seltener zu einer Hypertension kommt und sie dafür weniger geeignet ist. Leelahavanichkul et al. 2010 empfiehlt zu einer Steigerung der Hypertension in C57BL/6 Mäusen eine 5/6 Nephrektomie und die Verabreichung von Angiotensin II. Mohammed-Ali et al. 2015 verbinden wiederum mehrere Methoden miteinander und unterziehen die Mäuse einer unilateralen Nephrektomie, DOCA bekamen sie über ein Implantat und zusätzlich Angiotensin II Infusionen. Dies führte in dieser Studie zu einer signifikanten CKD in C57BL/6 Mäusen.

In Bezug auf die Wahl des Versuchstieres ergibt die Literatur, dass das Modell der 5/6 Nephrektomie auch mit Ratten durchgeführt werden kann und ursprünglich für diese entwickelt wurde (Rabe und Schaefer 2016). Der Ausgang einer 5/6 Nephrektomie ist sehr abhängig von dem jeweiligen Stamm, der verwendet wird. So wird auch wie oben genannt weniger zu C57BL/6 Mäusen geraten als vielmehr zu 129Sv oder CD-1 Mäusen. So wird von der Verwendung von C7BL/6 Mäusen bei 5/6 Nephrektomien von Yang et al. 2010, Rabe und Schaefer 2016 und Leelahavanichkul et al. 2010 eher abgeraten.

Diesbezüglich ist hier zu erwähnen, dass bei der Verwendung von C57BL/6 Mäusen zwischen N und J unterschieden wird, da sie sich je nach Herkunft und Typus in ihrem Verhalten und ihre Reaktionsweise unterscheiden und zusätzlich Unterschiede im Genom identifiziert werden konnten. Usami et al. 2018 geben in ihrer Vergleichsstudie zwischen N und J Tieren an, dass BL/6J Mäuse Gene, welche die Bildung von Nierensteinen fördern, deutlich stärker exprimieren als bei BL/6N. Dies führte zu einer erhöhten Ablagerung von

Nierenkristallen bei ihren Versuchstieren. Unklar ist jedoch, ob sich diese genetischen Unterschiede auf die Begünstigung einer CKD auswirken. Auf Grund dieser Tatsachen empfiehlt es sich in den Studien anzugeben welcher Stamm von C57BL/6 verwendet wurde. Bei der Verwendung von Ratten als Versuchstier ist als Vorteil anzuführen, dass in diesem Modell der Stamm keine Auswirkung auf die Ergebnisse hat (Bao et al. 2018). Als Nachteil gegenüber von Mäusen wird von Yang et al. 2010 angegeben, dass Ratten jedoch öfters auf Grund einer Urämie versterben, welche in Woche 12 beginnt. Ein möglicher weiterer Vorteil an Ratten liegt wahrscheinlich an ihrer Größe und somit erleichterten Operationsbedingungen. Da eine 5/6 Nephrektomie eine Operation erfordert, ist dies auch ein Nachteil dieses Modells (Bao et al. 2018).

Hier wäre zu erwähnen, dass wir in unseren Experimenten mit 5/6-nephrektomierten Mäusen eine 100% Überlebensquote bis zur 12. Woche post-OP hatten. Tan et al. berichten, dass bei der von ihnen durchgeführten Weise der Ablationsmethode, bei der zuerst eine Entfernung der rechten Niere erfolgt und eine Woche später an der zweiten Niere die beiden Nierenpole über eine Inzision in der Flanke ohne Ligation oder Abklemmen abgekappt werden, eine Überlebenschance von 40% gegeben war. Weiters wird von Tan et al. 2019 noch die Ligationmethode beschrieben. Im Gegensatz zu der vorherigen Methode werden in diesem Fall beide Nierenpole der verbliebenen Niere mit einem 3-0 nicht resorbierbaren Faden ligiert. Die Überlebensrate dieser Mäuse betrug jeweils in der Woche vier und Woche zwölf 80 %. Eine mögliche Erklärung für die Überlebenswahrscheinlichkeit von 40 % in der Technik ohne Legierung ist, dass es bei dem Abkappen der Nierenpole zu vermehrten Blutungen kommt. Um die Überlebensrate der Versuchstiere zu steigern, beinhaltet die zweite Operationsmethode die Tan et al. 2019 beschreiben eine reine Ligation der Nierenpole, was zu einer Unterbindung der Blutzufuhr führt, was wiederum eine Blutung verhindert. In der bei uns angewandten Methode werden zwar die Nierenpole abgetrennt, aber im Zuge der Operation wird vor Abkappen der Nierenpole die Nierenarterie und Venen mit einer Arterienklemme abgeklemmt, was kurzfristig den Blutzufluss verhindert. Zusätzlich wird das Gewebe nach Entfernen der Pole mit einem Elektrokauter gekautert und eine hämostatische Kollagen-Membran verwendet. Dabei handelt es sich um eine sehr schonende Methode, was sich in der Überlebenschance widerspiegelt. Von einem anderen Autor (Gava et al. 2012) wird eine weitere Herangehensweise an die 5/6 Nephrektomie beschrieben. In diesem Fall wurden die Nierenpole der linken Niere mit einem resorbierbaren Polyglycolsäurefaden ligiert und in derselben Operation die rechte Niere entfernt. Leider

kann hier nicht weiter auf die Überlebensrate der Mäuse eingegangen werden, da Gava et al. 2012 nicht angibt, wie hoch diese war. Jedoch hat diese Methode keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie.

5 Zusammenfassung

CKD ist, sowohl bei Menschen als auch bei Tieren, eine weit verbreitete Krankheit was sie besonders interessant für die Forschung macht.

Um eine CKD in Versuchen zu simulieren ist ein gerne verwendetes Modell die 5/6 Nephrektomie und ebenso wie diese sind C57BL/6 Mäuse ein besonders häufig verwendeter Mausstamm. In dieser Zeitverlaufsstudie wurde ermittelt, wie sich eine 5/6 Nephrektomie bei C57BL/6 Mäusen in Bezug auf die Bildung von Fibrose in der Niere auswirkt.

Für diesen Versuch wurden insgesamt 62 männliche C57BL/6N Mäuse verwendet. Sie wurden mit Normaldiät aufgezogen und zwei Wochen vor dem Eingriff auf ein Kalzium- und Phosphat-reiches Futter umgestellt und je in 2er Paaren bei 22-24 °C und 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Um die 5/6 Nephrektomie zu erreichen, wurden die Mäuse auf zwei Mal operiert, wobei in der ersten Operation die Nierenpole der linken Niere entfernt wurden und eine Woche später in einer zweiten Operation die komplette rechte Niere entfernt wurde. Zu Kontrolle wurden 30 Mäuse scheinoperiert, wobei auch hier die Niere in einer OP freigelegt, anschließend repositioniert und zugenäht wurde. Die Mäuse wurden nach vier, acht und zwölf Wochen zu je 10 bzw. 12 Gruppen euthanasiert, das restliche Nierengewebe entnommen, in Paraffin eingelegt, geschnitten und anschließend sowohl mit HE also auch mit Pikrosirius-Rot gefärbt und ausgewertet.

Anhand der Ergebnisse ist ersichtlich, dass die Mäuse, die 5/6-nephrektomiert wurden, eine deutlichere Nieren-Fibrose ausbilden als jene Tiere, die scheinoperiert wurden.

Als weiterführende Forschung würde sich hier eine Vergleichsstudie sowohl zwischen C57BL/6N als auch C57BL/6J anbieten, da anhand von anderen Studien bekannt ist, dass die beiden Stämme unterschiedlich reagieren können. Weiters wäre es interessant Ratten und Mäusen zu vergleichen, um zu sehen welches Modell das effizientere ist bezogen auf Kosten, den Aufwand als auch was die Ergebnisse betrifft, da das Modell der 5/6 Nephrektomie ursprünglich für Ratten entwickelt wurde.

6 Summary

Fibrosis development in the kidney in an experimental chronic kidney disease model in mice.

CKD is a common disease in both humans and animals, which makes it particularly interesting for research.

To simulate CKD in experiments, a popular model is the 5/6 nephrectomy and like this, C57BL/6 mice are a particularly commonly used mouse strain. In this time-course study, we determined how 5/6 nephrectomy affects C57BL/6 mice in terms of fibrosis formation.

A total of 62 male C57BL/6N mice were used for this experiment. They were reared on ND and switched to a CPD diet two weeks prior to the procedure and were maintained in pairs of 2 at 22-24 °C and 12/12-hour rhythms. To achieve 5/6 nephrectomy, mice were operated on twice, with the renal poles of the left kidney removed in the first operation and the complete right kidney removed in a second operation one week later. As a control, 30 mice were sham-operated, exposing the kidney, followed by repositioning and suturing. The mice were euthanized after four, eight and twelve weeks in groups of 10 and 12, respectively. The remaining kidney tissue was removed, placed in paraffin, sectioned and subsequently stained with HE as well as PSR and evaluated.

Based on the results, it is evident that the mice that underwent 5/6-nephrectomy developed more marked fibrosis than those animals that only underwent sham surgery.

Further research would be a comparative study between C57BL/6N and C57BL/6J, since it is known from other studies that the two strains react differently. Furthermore, it would be interesting to compare rats and mice to see which model is the more efficient in terms of cost, effort and outcome, as the 5/6 nephrectomy model was originally developed for rats.

7 Literaturverzeichnis

Ammirati A. 2020. Chronic kidney disease. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 66:3-9.

Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. 2018. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological research*, 39(2):72-86.

Chen H, Dunaevich A, Apfelbaum N, et al. 2020. Acute on chronic kidney disease in cats: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *Journal Vet Intern Med*, 34:1496– 1506.

Fromm M, Gäbel G. 2005. Niere. In: Engelhardt W, Hrsg. *Physiologie der Haustiere*. Zweite Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag, 277-307.

Gava AL, Freitas FP, Balarini CM, Vasquez EC, Meyrelles SS. 2012. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 4(3):167-73.

Gille U. 2008. Harn- und Geschlechtsapparat. In: Salomon F, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin*. Zweite Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag. 368-379.

Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA. 2015. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nature medicine*, 21(9):989–997.

Hamzaoui M, Djerada Z, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, Guerrot D. 2020. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. *Scientific reports*, 10:1524.

Hewitson TD, Ono T, Becker GJ. 2009. Small animal models of kidney disease: a review. *Methods in molecular biology*, 466:41–57

Kain R, Pagitz M. 2017. Chronic kidney failure affects humans and other mammals. In: Jensen-Jarolim E. Comparative Medicine. Springer-Verlag.

Kurz A, Wagner C. 2017. Niere und Salz-/Wasserhaushalt. In: Duale Reihe, Physiologie. Dritte vollständig überarbeitete Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag. 295-335.

Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, Mizel D, Zhou H, Wright EC, Kopp JB, Schnermann J, Yuen PS, Star RA. 2010. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney international*, 78(11):1136-53.

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. 2002. National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*, 139(2):137-47.

Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature medicine*, 21(9):998-1009.

Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. 2009. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental animals*, 58(2): 141-149.

Mohammed-Ali Z, Cruz GL, Lu C, Carlisle RE, Werner KE, Ask K, Dickhout JG. 2015. Development of a Model of Chronic Kidney Disease in the C57BL/6 Mouse with Properties of Progressive Human CKD. *Biomed Res Int*. 2015.

Vollmerhaus B, 2004. Harnorgane. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Frewein J, Gasse H, Leiser R, Roos H, Thome H, Vollmerhaus B, Waibl H. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 2: Eingeweide. 9 Aufl. Stuttgart: Parey-Verlag, 309-341

Rabe M, Schaefer F, 2016. Non-Transgenic Mouse Models of Kidney Disease. *Nephron* 2016, 133:53-61.

Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner C, Anders HJ. 2017. Chronic kidney disease. *Nature reviews. Disease primers*, 3:17088

Silbernagel S, Despopoulos A. 2007. *Taschenatlas Physiologie*. Stuttgart: Thieme-Verlag. 148-188.

Tan RZ, Zhong X, Li JC, Zhang YW, Yan Y, Liao Y, Wen D, Diao H, Wang L, Shen HC. 2019. An optimized 5/6 nephrectomy mouse model based on unilateral kidney ligation and its application in renal fibrosis research. *Renal failure*, 41(1): 555-566.

Usami M, Okada A, Taguchi K, Hamamoto S, Kohri K, Yasui T. 2018. Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition. *Urolithiasis*, 46(6):515-522.

Vandamme TF. 2014. Use of rodents as models of human diseases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(1): 2-9.

Vanhooren V, Libert C. 2013. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1):8-21.

Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. 2010. Models of chronic kidney disease. *Drug discovery today. Disease models*. 7(1-2):13-19.

Zhao XC, Livingston MJ, Liang XL, Dong Z. 2019. Cell Apoptosis and Autophagy in Renal Fibrosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 1165:557-584.

Zhou D, Liu Y. 2016. Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nature reviews. Nephrology*, 12(2): 68-70.

8 Liste der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Darstellung einer Maus in Narkose für 5/6 Nephrektomie	14
Abbildung 2: Darstellung der Niere nach entfernen des cranialen Nierenpols.	15
Abbildung 3: Darstellung gekauterte Niere.....	15
Abbildung 4: Darstellung der fertig 2/3 nephrektomierten Niere.	16
Abbildung 5: Entfernung der zweiten Niere.....	16
Abbildung 6: Histologische Darstellung der Niere in HE-Färbung.....	20
Abbildung 7: Histologische Darstellung Niere in PSR-Färbung.....	22
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Fibrosen Ergebnisse.	25
Abbildung 9: Histologische Darstellungen der SH und NX Nieren in Woche 4,8,12 in PSR-Färbung.....	26
Abbildung 10: Histologische Darstellungen der SH und NX Nieren in Woche 4,8,12 in HE-Färbung.....	27
 Tabelle 1: Auswertung der Nierenschnitte	 24

9 Abkürzungsverzeichnis

AKI	Akute Nierenversagen
CKD	Chronische Niereninsuffizienz
CPD	kalzium- und phosphatreiche Diät
DOCA	Deoxycorticosterone Acetate
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
EtOH	Ethanol
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H ₂ O	Wasser
ND	Normaldiät
Nx	Operierte Mäuse
OT	Objektträger
PAS	periodic-acid-schiff reaction
PSR	Picro-Sirius-Red
SHAM	Schein operierte Mäuse
UUO	Unilaterale urethrale Obstruktion