

Aus dem Department für Physiologie und Pathophysiologie

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold Erben)

Zeitverlauf der Veränderungen im Arbeitsmyokard in einem experimentellen Niereninsuffizienz-Mausmodell

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Isabella Reitinger

Wien, im März 2023

Wissenschaftliche/r BetreuerIn: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Dr.med. Reinhold Erben

Institut für Physiologie

GutachterIn: Ao.Univ.-Prof. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Ingrid Walter

Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Zielsetzung und Forschungsschwerpunkt.....	5
2	Literaturübersicht.....	6
2.1	Physiologie der Niere.....	6
2.1.1	Die Aufgaben der Niere und Nierenfunktion.....	6
2.2	Chronische Niereninsuffizienz.....	8
2.2.1	Allgemeines.....	8
2.2.2	Ätiologie und Pathogenese.....	9
2.2.3	Erhöhtes Kardiovaskuläres Risiko bei CNI.....	11
2.2.4	Die Rolle des FGF23.....	12
2.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.....	13
2.3.1	Kardiales Remodeling.....	13
2.3.2	Linksherzhypertrophie.....	14
2.3.3	Fibrose.....	15
3	Material und Methode.....	16
3.1	Tiere.....	16
3.2	Chronische Niereninsuffizienz im Mausmodell.....	16
3.3	Histologie der Herzen.....	17
3.3.1	Paraffinschnitttechnik.....	17
3.3.2	Färbemethoden.....	18
4	Ergebnisse.....	21
4.1	Hämatoxylin-Eosin (HE).....	21

4.1.1	Histologie der Herzschnitte	21
4.2	Picro-Sirius-Red (PSR).....	23
4.2.1	Histologie der Herzschnitte	23
4.2.2	Fibroseanteil im Vergleich CNI und Sham	25
4.3	Wheat germ agglutinin (WGA).....	26
4.3.1	Histologie der Herzschnitte	26
4.3.2	Kardiomyozytengröße im Vergleich CNI und Sham	29
5	Diskussion	30
6	Zusammenfassung	31
6.1	Zusammenfassung (deutsch)	31
6.2	Summary (english).....	32
7	Literaturverzeichnis.....	33
8	Abbildungsverzeichnis	35
9	Anhang	37
9.1	Protokoll H&E-Färbung.....	37
9.2	Protokoll PSR-Färbung.....	38
9.3	Protokoll WGA-Färbung.....	39

1 Einleitung

Chronische Nierenerkrankungen sind weltweit ein bedeutendes medizinisches Problem sowohl bei Tieren als auch bei uns Menschen. Eine Vielzahl von Ätiologien (einschließlich genetische, autoimmune, infektiöse, umweltbedingte, medikamentöse Faktoren) tragen zu den unterschiedlichsten primären Leiden bei, aber letztendlich können alle zum selben Ergebnis chronische Niereninsuffizienz (CNI) führen (Yang et al. 2010).

Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Nierenerkrankung im Endstadium weisen weiterhin eine hohe Morbidität und Mortalität auf, meist als Folge extrem hoher Raten von kardiovaskulären Komplikationen (Kovesdy 2013).

CNI-Tiermodelle können uns dabei helfen, krankheitsspezifische Mechanismen sowie Pathogenesen verschiedener Krankheiten besser zu untersuchen, um schlussendlich für neuartige Therapien zu sorgen (Yang et al. 2010).

1.1 Zielsetzung und Forschungsschwerpunkt

Chronische Niereninsuffizienz ist bei humanen und veterinärmedizinischen Patienten häufig mit einer linksventrikulären Hypertrophie assoziiert. In experimentellen Mausmodellen für chronische Niereninsuffizienz gibt es zu dieser Fragestellung nur bruchstückhafte Daten, die sehr vom verwendeten Modell abhängen. In der vorliegenden Arbeit wurde der "Goldstandard" für Modelle der chronischen Niereninsuffizienz verwendet, die 5/6-Nephrektomie. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass 5/6-nephrektomierte Mäuse eine im Zeitverlauf progrediente Linksherzhypertrophie entwickeln.

2 Literaturübersicht

2.1 Physiologie der Niere

2.1.1 Die Aufgaben der Niere und Nierenfunktion

Die Niere hat fünf Hauptaufgaben. Zu diesen gehören:

1. Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten des Eiweißstoffwechsels und anderen toxischen Substanzen wie z.B.: Medikamente.
2. Erhaltung von Substanzen, diese werden entweder gar nicht filtriert (z.B.: großmolekulare Eiweiße) oder filtriert und anschließend wieder resorbiert wie beispielsweise Wasser, Zucker und Aminosäuren.
3. Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts.
4. Regulation des Säure-Basen-Haushalts.
5. Endokrine Funktionen durch Metabolismus und Produktion von Hormonen, z.B.: Blutdruck, Erythropoese, Ca^{2+} -Metabolismus (Engelhardt et al. 2015)

Um diese Vielzahl von Aufgaben zu ermöglichen, besitzt die Niere einen komplizierten Aufbau sowie eine hohe Anzahl an spezifischen Zelltypen. Die funktionellen Einheiten der Niere bilden die sogenannten Nephrone. Sie bestehen aus Glomerulus (= Nierenkörperchen) und Tubulussystem (Abbildung 2). Der sogenannte Primärharn (ca. 180l/d) entsteht durch die Filtration des Plasmas im Glomerulus. Dieser wird durch Sekretion und Rückresorption im Tubulussystem in seiner Zusammensetzung verändert, sodass schlussendlich der Endharn die Niere über den Harnleiter verlässt (Behrends et al. 2010).

Obwohl die Nieren nur weniger als 1% des Körpergewichts ausmachen, haben Säugetiernieren mit ca. 20% des Herzminutenvolumens eine extrem hohe Durchblutung. Zur Beurteilung der Nierenfunktion ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), von großer Bedeutung. Sie entspricht dem Volumen, das pro Zeiteinheit von den Glomeruli der Nieren filtriert wird. Bei einer Niereninsuffizienz kommt es zu einer Verringerung der GFR. Eine

gesunde Niere kann je nach Tierart 1/3 bis 1/5 des Plasmaflusses in den Glomeruli filtrieren. Als Urin ausgeschieden wird jedoch nur 1% des Primärharns (Engelhardt et al. 2015).

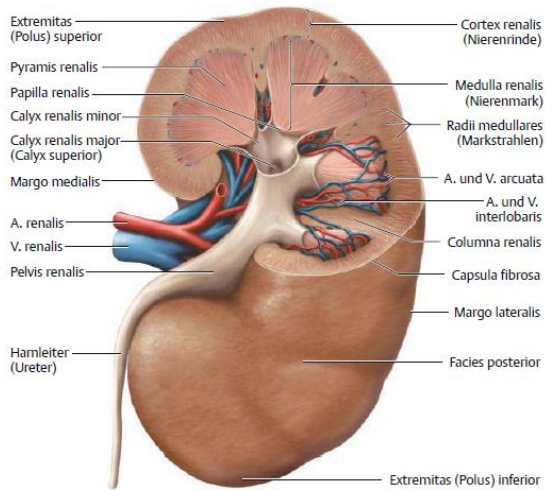


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau der Niere (Behrends et al. 2010).

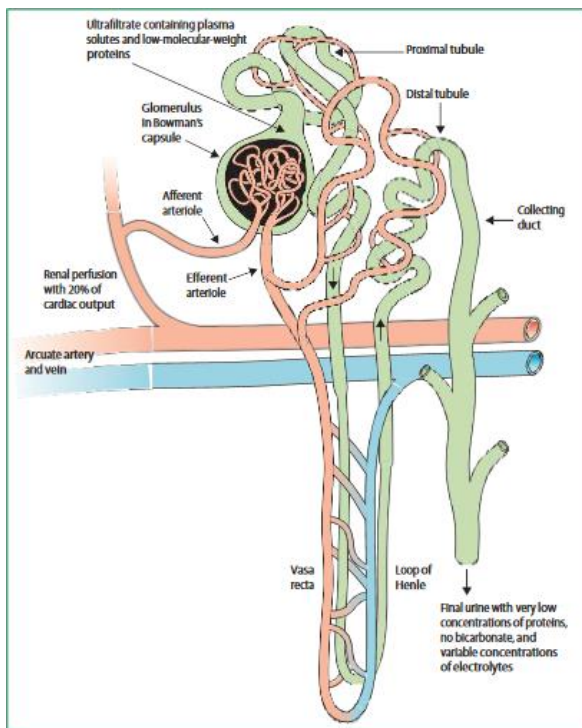


Abbildung 2: Aufbau eines Nephrons. Jede Niere enthält etwa 1 Million Nephrene, die funktionellen Einheiten der Niere. Sie bestehen aus Glomerulus und Tubulussystem. Den proximalen und distalen Tubulus kann man jeweils in einen *aufgeknäuelten* Teil (Pars convoluta oder Pars contorta) und einen *geraden* Teil (Pars recta) segmentieren. Die geraden Teile des proximalen und distalen Tubulus und der Intermediärtubulus werden zur Henle-Schleife zusammengefasst. Die letzten Teile dieser Tubuli bilden die Sammelkanäle, die in das Nierenbecken münden (Eckhardt et al., 2013).

2.2 Chronische Niereninsuffizienz

2.2.1 Allgemeines

Ein Nierenversagen entsteht, wenn 75 % der Nephrone beider Nieren zerstört sind. Ein plötzlicher Funktionsverlust, verursacht meistens durch ischämische, toxische oder infektiöse Ereignisse, führt zu einem akuten Nierenversagen (akute Niereninsuffizienz, ANI). Dabei werden meist die metabolisch aktiven Epithelzellen des proximalen Tubulus und des aufsteigenden Teils der Henle-Schleife geschädigt. Die Folge ist eine gestörte Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie aller anderen gelösten Stoffe. Die sekundär auftretende Vasokonstriktion verringert zusätzlich die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Ein akutes Nierenversagen ist potentiell reversibel. Demgegenüber sind Schädigungen der Nephrone bei CNI meist irreversibel. Funktionslose Nephrone werden durch Bindegewebe ersetzt. Deswegen ist die ursprüngliche Ursache im Endstadium einer Niereninsuffizienz nicht mehr erkennbar. Chronisches Nierenversagen stellt einer der häufigsten Todesursachen in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin dar und entwickelt sich über Wochen, Monate und Jahre (Couto und Nelson 2010).

Begriffe:

Azotämie bezeichnet die Erhöhung von Harnstoff, Kreatinin und anderer Stickstoffverbindungen (außer Proteine) im Blut. Unter Renaler Azotämie versteht man eine Azotämie, die durch Schädigung des Nierenparenchyms entstanden ist. (Couto und Nelson 2010)

Nierenversagen beschreibt den Zustand eingeschränkter Nierenfunktion, in dem Azotämie und der Verlust der Konzentrationsfähigkeit dauerhaft bestehen (Couto und Nelson 2010).

Von **Urämie** spricht man, wenn alle Urinbestandteile (= harnpflichtige Substanzen) im Blut vorhanden sind. Sie entsteht sekundär infolge eines Nierenversagens oder durch postrenale Ereignisse (Harnröhrenverschluss, Harnblasenruptur) (Couto und Nelson 2010).

2.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Bei der CNI ist immer der Funktionsverlust des gesamten Nephrons die Folge einer irreversiblen tubulären oder glomerulären Schädigung, da die Gefäße und das Tubulussystem der Nephrone untrennbar miteinander verbunden sind. Folglich kommt es zu einer morphologischen Heterogenität der zerstörten Nephrone. Es können zahlreiche Veränderungen vorkommen, z.B.: hochgradige Atrophie, Ersatz des Gewebes durch Bindegewebe bis hin zur deutlichen Hypertrophie. Die eigentlichen Auslöser für eine CNI sind meist nicht bekannt. Mögliche Ursachen sowohl für Tiere und Menschen für eine CNI sind:

- Immunopathien: Glomerulonephritis, Vaskulitis, systemischer Lupus erythematodes
- Amyloidose
- Diabetes mellitus
- Hypertonie
- Neoplasie: primär, sekundär
- Nephrotoxische Stoffe
- Nierenischämie
- Entzündliche oder infektiöse Ursachen: Nierensteine, Pyelonephritis
- Erbliche oder angeborene Ursachen: Nierenhypoplasie/Nierendysplasie, Zystennieren
- Obstruktion des Abflusstrakts: Harnleitersteine (Harnstau → Urosepsis)
- Idiopathisch (Couto und Nelson 2010)

Alle betroffenen CNI Patienten zeigen eine reduzierte GFR. Bei Menschen liegt der Wert bei $<60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ für mindestens drei Monate (Küçüköylü und Rump 2012). Die Folge einer verminderten GFR ist die Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Stoffen, die normalerweise über die Nieren ausgeschieden werden. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem: Aminosäuren, Ammoniak, Harnstoff, Kreatinin, Parathormon, Gastrin, Phosphat, sowie der Wachstumsfaktor Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23). Die entstandene Urämie sorgt für ein Ungleichgewicht des Wasser- und Salzhaushaltes, Anämie, neurologische Symptome, gastrointestinale Störungen, Osteodystrophie, Immunschwäche sowie Herz-Kreislaufstörungen wie Hypertonie. Bei einer CNI spielen auch hormonelle Störungen eine wichtige Rolle. Durch die verminderte Bildung von Erythropoetin (EPO), welches

hauptsächlich in der Niere produziert wird und die Erythropoese steuert, entsteht eine aregenerative Anämie (Couto und Nelson 2010). Die erhöhten Serumkonzentrationen von Gastrin und Parathormon führen zur Entwicklung einer Gastritis bzw. eines Hyperparathyreoidismus.

Durch die Hyperphosphatämie wird freies Calcium komplexiert, was die Folge einer Hypokalzämie hat. Zusätzlich ist bei CNH die Hydroxylierung von Calcidiol zu Calcitriol vermindert. Aufgrund des Mangels an Calcitriol und der Hypokalzämie entsteht ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, was zu einer Störung des Calciums-Phosphat Haushalts führt. Dies ist neben der Urämie der Hauptgrund für die Arteriosklerose, da es zu Calcium und Phosphat Ablagerungen kommt (Eckhardt et al. 2013).

In Abbildung 3 werden die wichtigsten Nierenfunktionen mit Interaktionen mehrerer Organe nochmals zusammengefasst.

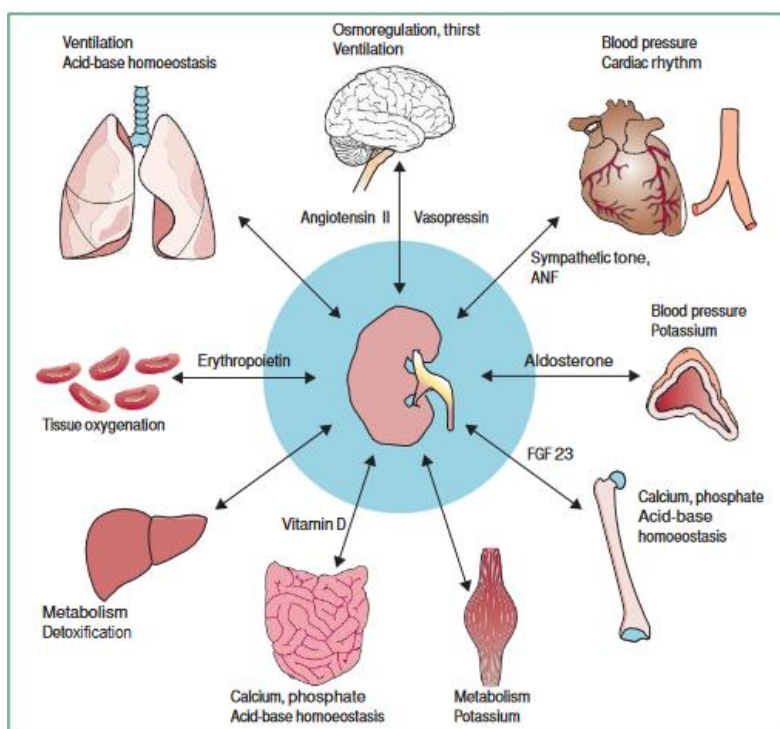


Abbildung 3: Einfluss der Nierenfunktion auf wesentliche homöostatische Prozesse. FGF= Fibroblasten-Wachstumsfaktor. ANF= atrialer natriuretischer Faktor (Eckhardt et al., 2013).

2.2.3 Erhöhtes Kardiovaskuläres Risiko bei CNI

In früheren Studien wurde belegt, dass schon frühe Stadien der chronischen Niereninsuffizienz und eine verminderte GFR das Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung zunehmend erhöhen. Im Jahr 2004 ergab eine Analyse von 1,1 Mio. amerikanischer Patientendaten eine besonders starke Korrelation zwischen einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate von <60 ml/min/1,73 m², der Gesamtmortalität und kardiovaskulären Ereignissen. Das Sterberisiko stieg hierbei bei einer GFR von 45-60 ml/min um das 1,4-fache und bei einer GFR von 15-30 ml/min um das 3-fache (Küçüköylü und Rump 2012).

Eine zusätzliche globale Studie aus dem Jahre 2013 zeigte, dass eine Verringerung der GFR mit 4 % der Todesfälle weltweit, d.h. mit 2,2 Millionen Todesfällen, verbunden war. Mehr als die Hälfte der Todesfälle waren auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen, während 0,96 Millionen Menschen im Endstadium einer CNI waren (Ammirati 2020).

Neben der verringerten GFR sorgt auch die Albuminurie als unabhängiger Faktor bei der CNI für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. In einer großen Studie aus Kanada konnte gezeigt werden, dass die Albuminurie bzw. Proteinurie in jedem CKD-Stadium einen Einfluss auf kardiovaskuläre Folgen hat (Küçüköylü und Rump 2012).

2.2.3.1 *Arterielle Hypertonie bei eingeschränkter Nierenfunktion*

Es wurde belegt, dass fast alle Personen mit einer Nierenerkrankung an einer arteriellen Hypertonie, die eindeutig mit der kardiovaskulären Entwicklung und der Expansion der Niereninsuffizienz korreliert (Küçüköylü und Rump 2012).

Die Ursachen einer arteriellen Hypertonie bei CNI sind vielseitig. Im Laufe der CNI folgt eine Aktivierung des Sympathikus. Diese führt zur β_1 -adrenozeptorvermittelten Reninfreisetzung und somit zur Aktivierung des RAAS (= Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) (Küçüköylü und Rump 2012).

Renin ist ein Hormon und wird in der Niere produziert, genauer gesagt von den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates. Es spaltet als Protease aus dem in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen das Angiotensin I (ANG I) im Plasma ab, welches zum Angiotensin II (ANG II) mittels des Angiotensin I-Converting-Enzym (ACE) verkürzt wird. Durch ANG II wird die Synthese des Mineralokortikoids Aldosteron der

Nebennierenrinde gesteigert. ANG II und Aldosteron kontrollieren gemeinsam Blutdruck, Extrazellulärvolumen und Natrium-/Kaliumhaushalt (Behrends et al. 2010).

Somit führt eine Aktivierung des RAAS zu einer vermehrten Natriumrückresorption sowie durch ANG II ausgelöste Vasokonstriktion. Folglich erhöhen sich der periphere Widerstand, das Herzminutenvolumen und damit das kardiovaskuläre Risiko (Carracedo et al. 2020).

Darüber hinaus sorgen höhere ANG II und Aldosteronspiegel für eine vermehrte Inflammation und Fibrosierung sowie pathologische Veränderungen von Mesangial- und Endothelzellen in der Niere. (Küçüköylü und Rump 2012) Mehrere Studien haben eine enge Beziehung zwischen Entzündungsmarkern und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt (Carracedo et al. 2020).

Zusammenfassend führen all die oben genannten Mechanismen indirekt zu einer arteriellen Hypertonie. Die Hypertonie, als auch all die anderen Risikofaktoren für Herz-Kreislauf Erkrankungen wie Albuminurie und Inflammation lösen einen Umbau des Myokards (Remodeling) und der Blutgefäße aus. Folglich kann dies zur Entwicklung von Kardiomyopathie, erhöhter arterieller Steifigkeit und Arteriosklerose beitragen. Ohne Behandlung können diese Veränderungen zu ischämischer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und schlussendlich zum kardiovaskulärem Tod führen (Carracedo et al. 2020).

Desweiteren kommt es zur Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH), die in fast allen fortgeschrittenen Stadien der CNI zu erkennen ist. Die linksventrikuläre Hypertrophie steht eng mit der einhergehenden Herzinsuffizienz in Zusammenhang und gehört zu den Hauptursachen für den plötzlichen Herztod (Küçüköylü und Rump 2012).

2.2.4 Die Rolle des FGF23

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) ist ein neu entdecktes Hormon, welches im Knochen produziert wird und den Phosphat- und Vitamin-D-Stoffwechsel über die Niere reguliert. In den jüngsten Studien fand man heraus, dass FGF23 ein starker Risikofaktor für unerwünschte kardiovaskuläre Erkrankungen bei Patienten mit CNI und terminaler Niereninsuffizienz (ESRD) ist (Kovesdy und Quarles 2013).

Dabei handelt es sich um ein 32-kDa-Protein, welches in Osteoblasten und Osteozyten im Knochen produziert wird. FGF23 wird im Kreislauf freigesetzt und wirkt endokrin als

zirkulierendes Hormon. (Kovesdy und Quarles 2013) Es zielt hauptsächlich auf die Tubuluszellen der Niere und die Nebenschilddrüsenzellen. FGF23 bindet an FGF-Rezeptoren, wobei die Bindung abhängig vom essentiellen α -Klotho-Korezeptor ist, und führt in der Niere zur Ausscheidung von Phosphat, reduziert die Aktivierung von Calcidiol zu Calcitriol und erhöht den Abbau von Calcitriol (Stöhr et al. 2018).

Eine vermehrte Produktion von FGF23 findet man schon früh im Verlauf einer CNI aufgrund der Hyperphosphatämie. Frühere Forschungen haben belegt, dass erhöhte FGF23-Spiegel einen unabhängigen Risikofaktor für linksventrikuläre Hypertrophie und Mortalität bei Niereninsuffizienz darstellen. Außerdem führt eine Erhöhung von FGF23 zu einer Reduktion von Calcitriol und somit zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, was wiederum das Risiko einer kardiovaskulären Krankheit erhöht (Stöhr et al. 2018).

2.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Im Laufe einer CNI kann es als Folge von funktionellen sowie strukturellen Herzerkrankungen zu einer Herzinsuffizienz kommen, wie schon bei Punkt 2.2.3 beschrieben.

2.3.1 Kardiales Remodeling

Eine Veränderung der myokardialen Zellen in Größe und Form wird als Remodeling zusammengefasst. Dieser Umbauprozess kennzeichnet sich durch myokardiale Hypertrophie, Zellzerstörung oder Apoptose. Desweiteren kommt es zur strukturellen Veränderung der Extrazellulären Matrix (EZM) und zur Auflösung kollagener Bindungen zwischen den einzelnen Myokardzellen. Folglich kommt es zu einem Auseinanderweichen der Myozyten, was sich anhand einer Dilatation oder Formveränderung des Ventrikels äußert. Vorhandenes Gewebe wird durch Bindegewebe ersetzt (Fibrose). Als Ursache für diese Remodelingprozesse gelten mechanische Kräfte (z.B. erhöhte Wandspannung durch Volumen- oder Drucküberlastung), verschiedene hormonelle Signale (z.B. ANG II, Aldosteron) und Zytokine (Couto und Nelson 2010).

2.3.2 Linksherzhypertrophie

Die Linksherzhypertrophie ist bereits in frühen Stadien der CNI eine häufige Pathologie und sorgt für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko (Di Lullo et al. 2015).

Unter Hypertrophie versteht man die Größenzunahme einzelner Zellen. Bei einer LVH kommt es zu einer Gewebeergrößerung der Myokardzellen des linken Ventrikels. Es handelt sich um einen Kompensationsmechanismus des Herzens bei vermehrter mechanischer Belastung. Es können sich je nach Art der Belastung zwei voneinander gegensätzliche Anpassungsmodelle entwickeln. Eine Drucküberlastung, die z.B.: durch Bluthochdruck, Aortenstenose oder eine verminderte Gefäßelastizität durch Verkalkung verursacht wird, erfordert einen höheren Druck während der Ventrikelkontraktion. Hierfür werden kontraktile Proteineinheiten (= Sarkomere) hinzugefügt und parallel zueinander ausgerichtet, was zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten führt. Folglich kommt es zu einer Zunahme der Wanddicke und einer Verkleinerung des Ventrikels. Die sogenannte „konzentrische“ Hypertrophie führt zu einer verminderten diastolischen Compliance und fördert das Risiko einer Ischämie des Myokards (Middleto et al. 2001).

Bei einer Volumenüberlastung, wie z.B. bei Anämie oder Aorteninsuffizienz, kommt es zu einer Verlängerung der Myokardfasern durch serielle Sarkomerreplikation und einer Ventrikeldilatation. Diese „exzentrische“ Hypertrophie führt zu einer Erhöhung des systolischen Schlagvolumens. Wird dem nicht entgegengewirkt, kommt es zu einer erhöhten Wandspannung und einem erhöhtem Sauerstoffverbrauch (Middleto et al. 2001).

Bei anhaltender Druck- und Volumenüberlastung beschleunigt sich die Apoptose der Herzmuskelzellen, sowie die Entwicklung einer Fibrose, was das Risiko eines plötzlichen Herztodes erhöht (Middleto et al. 2001).

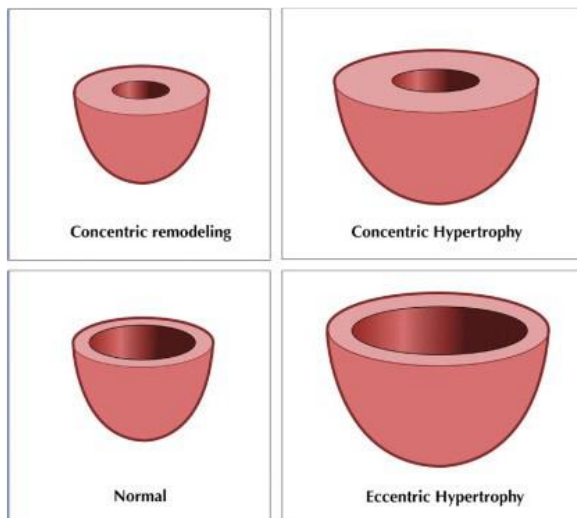


Abbildung 4: Die verschiedenen Ventrikelformen bei Hypertrophie. Links unten: die normale Ventrikelform unter physiologischen Bedingungen (normale Ventrikelmasse und relative Wanddicke); links oben: konzentrisches Remodeling (normale Ventrikelmasse, erhöhte relative Wanddicke); rechts oben: konzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei erhöhter relativer Wanddicke); rechts unten: exzentrische Hypertrophie (erhöhte Ventrikelmasse bei normaler relativer Wanddicke) (Simonini 2014).

2.3.3 Fibrose

Ein gesundes Myokard besteht zu einem großen Teil aus Kardiomyozyten, die restlichen zwei Drittel bilden Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und andere Zellen. Fibroblasten und Kardiomyozyten sind in die Extrazelluläre Matrix eingebettet, welche als eine Art Stützgerüst fungiert (Rademacher 2010).

Im Zuge einer LVH kommt es zu einer vermehrten Bildung von Bindegewebszellen und Kollagenfasern, es tritt eine myokardiale Fibrosierung auf (Rademacher 2010).

Eine übermäßige Einlagerung von Kollagen führt zu einer zunehmenden Versteifung des Myokards, einhergehend mit einer verminderten Compliance und somit zu einer diastolischen Dysfunktion. Desweiteren kann es zu einer systolischen Dysfunktion, welche durch eine Dilatation des linken Ventrikels mit anschließender Verschlechterung der Kontraktilität des Myokards gekennzeichnet ist, kommen (Simonini 2014).

3 Material und Methode

3.1 Tiere

Für alle Versuche wurden drei Monate alte männliche Mäuse verwendet. Die Tiere wurden bei 22 bis 24°C und einem 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit Rhythmus gehalten. Sie hatten Zugang zu normalen Nagerfutter, Wasser und wurden zusätzlich mit einer Rescue Diät gefüttert. Diese beinhaltet einen hohen Anteil an Phosphat und Calcium.

Um die Veränderungen im Arbeitsmyokard des linken Ventrikels ermitteln zu können, wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltete 10 Mäuse, die zweite 6 und die dritte 12. Für die Kontrollgruppe verwendete man für die erste Gruppe 10, die zweite 6 und die dritte 10 Tiere. Für die Organgewinnung wurde die erste Gruppe vier Wochen nach Induktion der chronischen Niereninsuffizienz euthanasiert, die zweite und dritte Gruppe jeweils nach acht bzw. 12 Wochen. Die Euthanasie erfolgte unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin (50 mg/kg s. c.) und Medetomidin (0,5 mg/kg s. c.).

Alle Tierversuche wurden von den Ethikkommissionen der Veterinärmedizinischen Universität Wien und des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWF-68.205/0054-II/3b/2013).

3.2 Chronische Niereninsuffizienz im Mausmodell

Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) bei den Versuchsmäusen wurde durch eine 5/6 Nephrektomie erreicht, der "Goldstandard" für Modelle der chronischen Niereninsuffizienz. Diese umfasst zwei Operationen, in welchen zuerst Teile der linken Niere entfernt wurden und eine Woche später die gesamte rechte Niere. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Mäuse drei Monate alt. Die Narkose der Tiere wurde mit Ketamin (15 mg/kg s. c.) und Medetomidin (0,2 mg/kg s. c.) eingeleitet. Zur Erhaltung der Anästhesie wurde Isofluran verwendet.

Im ersten Schritt wurde nach Abklemmen der Nierenarterie die Kapsel der linken Niere gelöst und zwei Drittel der Niere reseziert, indem man den cranialen und caudalen Nierenpol entfernte. Der Zugang erfolgte dabei über die linke Flanke.

7 Tage nach dem Eingriff wurde im zweiten Schritt nach Ligation der Nierengefäße und des Ureters die gesamte rechte Niere entfernt. Der Zugang fand über die rechte Flanke statt. Insgesamt blieb 18% gesundes Nierengewebe übrig. Zum postoperativen Schmerzmanagement wurde den Mäusen drei Tage lang Buprenorphin (0,1 mg/kg s. c.) und Metamizol (200 mg/kg s. c.) verabreicht.

Die sogenannten *Sham* (scheinoperierten) Mäuse dienten zur Kontrollgruppe. Die Operation lief auf folgende Weise ab: Im ersten Schritt wurden cranialer und caudaler Pol der linken Niere dargestellt, indem man die linke Flanke eröffnete. Anschließend wurde die Inzision anhand einer Naht wieder verschlossen. Im zweiten Schritt wurde mittels Eröffnung der rechten Flanke die rechte Nierenarterie dargestellt und gleichermaßen wieder zugenäht. Bei den *Sham* Mäusen wurde keine Nierenschädigung hervorgerufen.

3.3 Histologie der Herzen

3.3.1 Paraffinschnitttechnik

Zur Anfertigung von histologischen Schnitten erfolgte zunächst die Fixierung der Mäuseherzen in 4% Formaldehyd. Dies geschah sofort nach der Organentnahme. Um das Formalin wieder herauszulösen, wurden die Herzen in einem Phosphatpuffer mit 7,5%iger Saccharose gewaschen. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% Ethanol → 80% Ethanol → 96% Ethanol → Isopropanol) dehydriert, dies führte zu einer Entwässerung und gleichzeitig Härtung des Gewebes. Nach einem Bad in Xylol, das Lösungsmittel des Einbettmittels, folgte das Einbetten mittels Paraffin in Einbettkassetten.

Die endgültigen histologischen Schnitte wurden mithilfe eines Rotations-Mikrotoms angefertigt. Für die weitere Bearbeitung mussten die Herzen zuvor bei einer Temperatur von -20°C tiefgekühlt werden. Beim Einspannen der Blöcke musste man auf das Zurückstellen des Messers achten. Anschließend tastete man sich vorsichtig an die Oberfläche des Blockes heran. Zunächst wurde manuell mit Kurbel geschnitten, um eine ebene Oberfläche zu erzeugen. Anfangs wurden die Blöcke in 15 µm Schritten grob getrimmt, um auf die Höhe der Papillarmuskeln zu gelangen. Sobald man die richtige Ebene gefunden hat, wurde auf Feintrieb umgestellt und 4 µm dicke Schnitte mithilfe eines Pinsels entnommen. Dabei war eine kontinuierliche Reihenfolge der Schnitte wichtig. Die entstandenen Schnitte wurden in

ein 42-45°C warmes Wasserbad gelegt, damit sie sich strecken konnten. Pro Herz wurden circa 50-60 Schnitte entnommen, je 2 Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen. Die fertigen Schnitte wurden bis zur Färbung in einem Wärmeschrank gelagert



Abbildung 5: Darstellung des Arbeitsplatzes. Mikrotom (links), Wärmebecken (rechts)

3.3.2 Färbemethoden

3.3.2.1 *Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)*

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung, kurz HE Färbung, ist als eine Standardfärbung der Histologie anzusehen und dient als Übersichtsfärbung. Bindegewebe, Zytoplasma und sonstige Strukturen des Gewebes werden rot angefärbt, die Zellkerne blau.

Für die Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal für je 15 Minuten in Xylol gegeben. Danach jeweils fünf Minuten in Isopropanol, 70%igen Ethanol und 40%igen Ethanol und abschließend in destilliertes Wasser gegeben.

Die Färbung der Zellkerne erfolgte in Hämatoxylin für max. vier Minuten und anschließendes Spülen in fließendem Leitungswasser für zehn Minuten. Das übrige Gewebe wurde im nächsten Schritt mittels Eosin für max. 5 Minuten gefärbt.

Als nächstes wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%iger Ethanol → 96%iger Ethanol → 100%iger Isopropanol) in Xylol überführt. Danach wurden sie mit DePeX eingedeckt und mit einem Deckgläschen fixiert.

Im Anhang 9.1 ist eine detaillierte Beschreibung zur HE-Färbung zu finden.

3.3.2.2 Picro-Sirius-Red Färbung

Zur Darstellung von Kollagenen wurden die fertigen Herzschnitte mittels Picro-Sirius-Red-Färbung angefärbt, um eine mögliche Fibrose im Myokard anzuzeigen. Hierfür wurden die Kollagenfasern rot angefärbt, Muskelfaser und Zytoplasma gelb, Zellkerne braun. Im polarisierten Licht erscheinen große Fibrillen gelb, kleine grün.

Für die Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal für je 15 Minuten in Xylol gegeben. Danach jeweils fünf Minuten in Isopropanol, 70%igen Ethanol und 40%igen Ethanol und abschließend in destilliertes Wasser gegeben.

Die Färbung mit Picro-Sirius-Red Solution wurde lichtgeschützt durchgeführt und umfasste für die Paraffinschnitte der Herzen eine Dauer von 60 Minuten. Nun unterzogen sich die Schnitte mehreren Waschschrinen: Zunächst lichtgeschützt zweimal für jeweils drei Minuten in angesäuerten Wasser. Um eine gute Färbung zu erhalten, wurden die Schnitte manuell getrocknet und danach zweimal für jeweils drei Minuten in Isopropanol gegeben. Abschließend wurden sie zweimal durch Xylol für sieben Minuten geführt.

Nach Abschluss der Färbung wurden die fertigen Gewebeschnitte mit DePeX eingedeckt und mit einem Deckgläschen fixiert. Bis zur mikroskopischen Evaluierung wurden die Schnitte lichtgeschützt unter Abdeckung einer Alufolie gelagert.

Im Anhang 9.2 ist eine detaillierte Beschreibung zur Picro-Sirius-Red Färbung zu finden.

3.3.2.3 *Wheat germ agglutinin (WGA) - Färbung*

Für die Färbung der extrazellulären Matrix und somit der indirekten Darstellung der Kardiomyozytengröße wurde Wheat-Germ-Agglutinin (WGA = Weizenkeimagglutinin; ein Lektin, das Weizen vor Insekten, Hefen und Bakterien schützt) benutzt. WGA ist an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher unter Fluoreszenz-Licht die extrazelluläre Matrix grün darstellt.

Für die Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal für je 15 Minuten in Xylol gegeben. Danach jeweils fünf Minuten in Isopropanol, 70%igen Ethanol und 40%igen Ethanol und abschließend in destilliertes Wasser gegeben.

Für die Färbung wurden die Herzschnitte zunächst für fünf Minuten in PBS gespült und danach mit einer angefertigten WGA Lösung für 60 Minuten in einer Edelstahlkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehreren Waschschrinen unterzogen: Zunächst zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS, danach wurden sie mit einer angefertigten DAPI Lösung für acht Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Nach Abschluss der Färbung wurden die fertigen Herzschnitte mit Fluoromount eingedeckt und mit einem Deckgläschen fixiert. Bis zur mikroskopischen Evaluierung wurden die Schnitte lichtgeschützt unter Abdeckung einer Alufolie gelagert.

Im Anhang 9.3 ist eine detaillierte Beschreibung zur WGA-Färbung zu finden.

4 Ergebnisse

4.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

4.1.1 Histologie der Herzschnitte

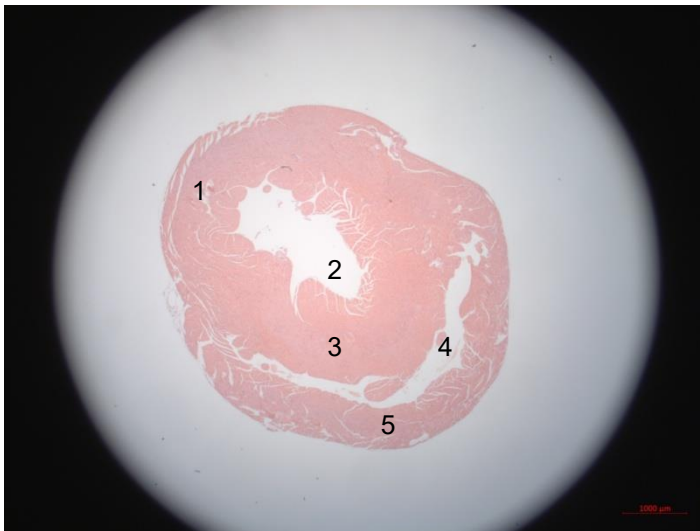


Abbildung 6: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 12,5fach; 1: Myokard linker Ventrikel, 2: Lumen linker Ventrikel, 3: Septum, 4: Lumen rechter Ventrikel, 5: Myokard rechter Ventrikel

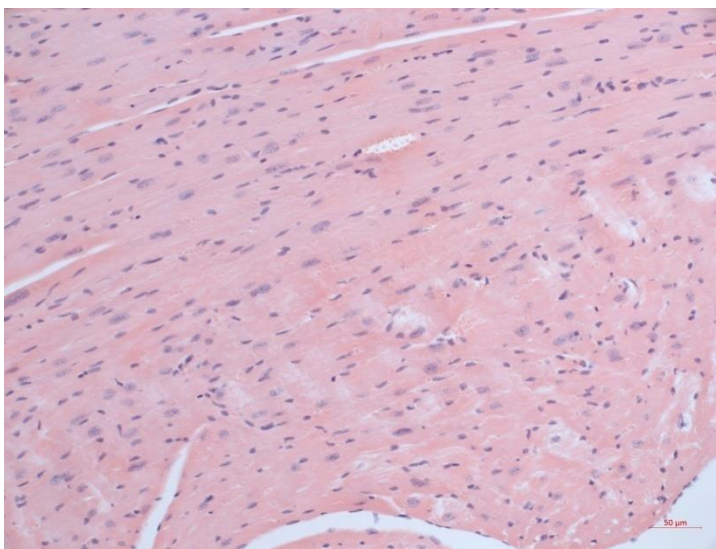


Abbildung 7: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 200fach

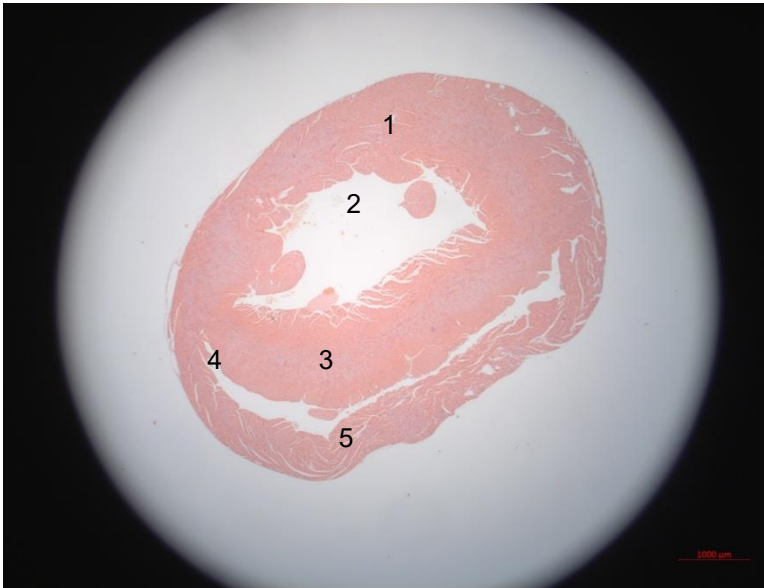


Abbildung 8: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 12,5fach; 1: Myokard linker Ventrikel, 2: Lumen linker Ventrikel, 3: Septum, 4: Lumen rechter Ventrikel, 5: Myokard rechter Ventrikel

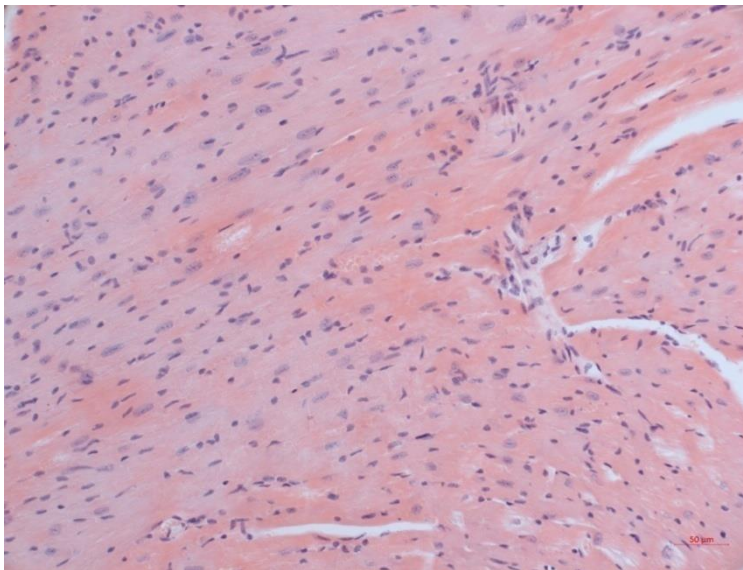


Abbildung 9: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 200fach

4.2 Picro-Sirius-Red (PSR)

4.2.1 Histologie der Herzschnitte

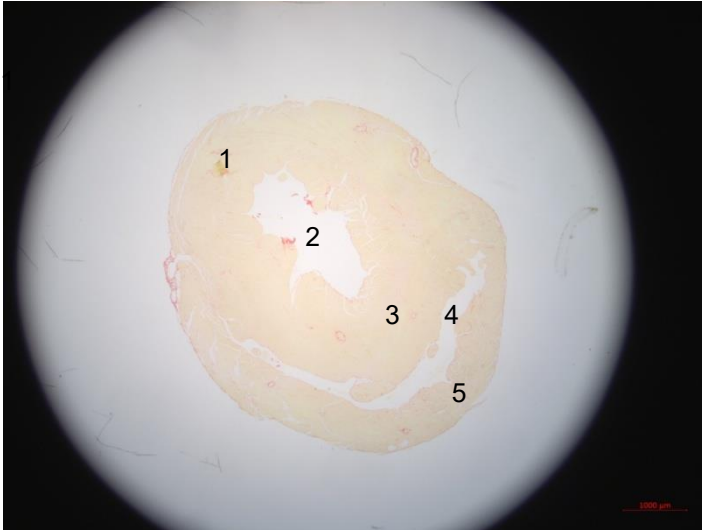


Abbildung 10: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 12,5fach; 1: Myokard linker Ventrikel, 2: Lumen linker Ventrikel, 3: Septum, 4: Lumen rechter Ventrikel, 5: Myokard rechter Ventrikel

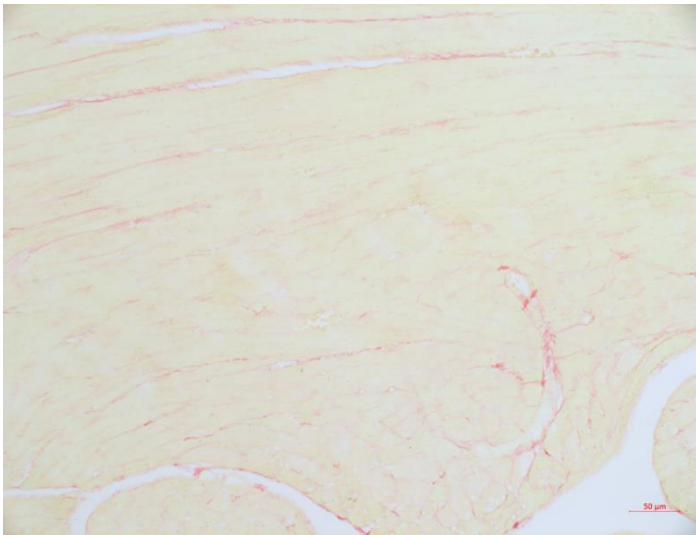


Abbildung 11: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 200fach

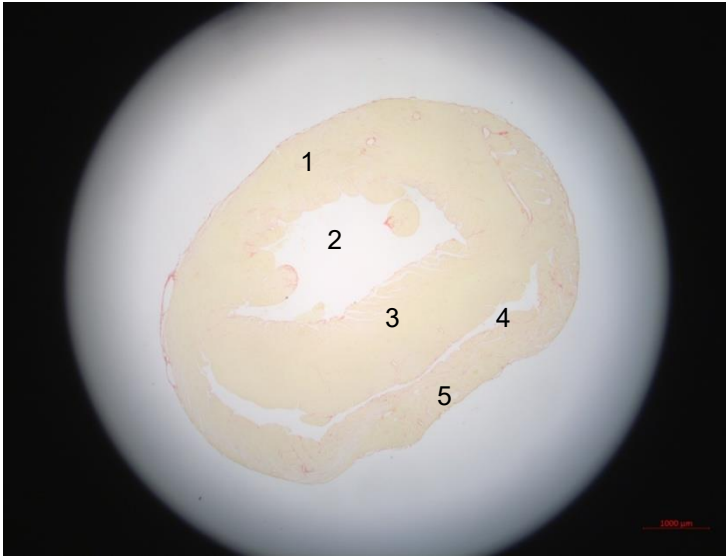


Abbildung 12: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 12,5fach; 1: Myokard linker Ventrikel, 2: Lumen linker Ventrikel, 3: Septum, 4: Lumen rechter Ventrikel, 5: Myokard rechter Ventrikel

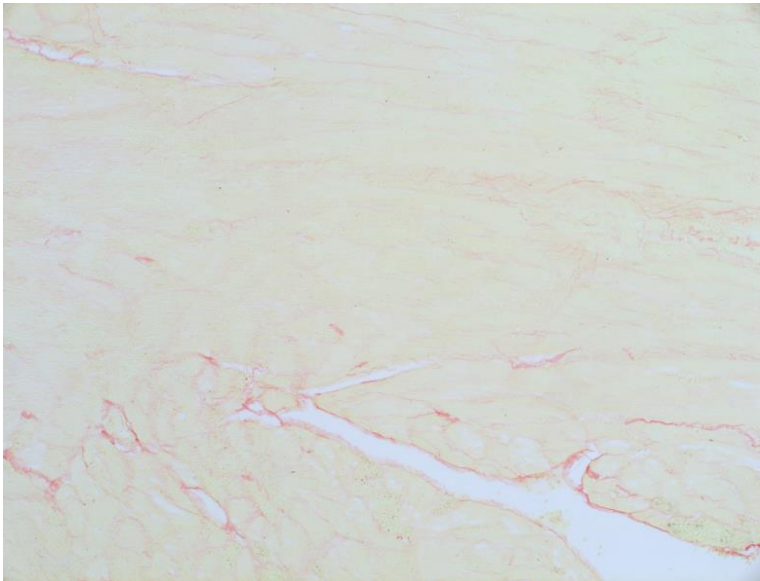


Abbildung 13: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 200fach

4.2.2 Fibroseanteil im Vergleich CNI und Sham

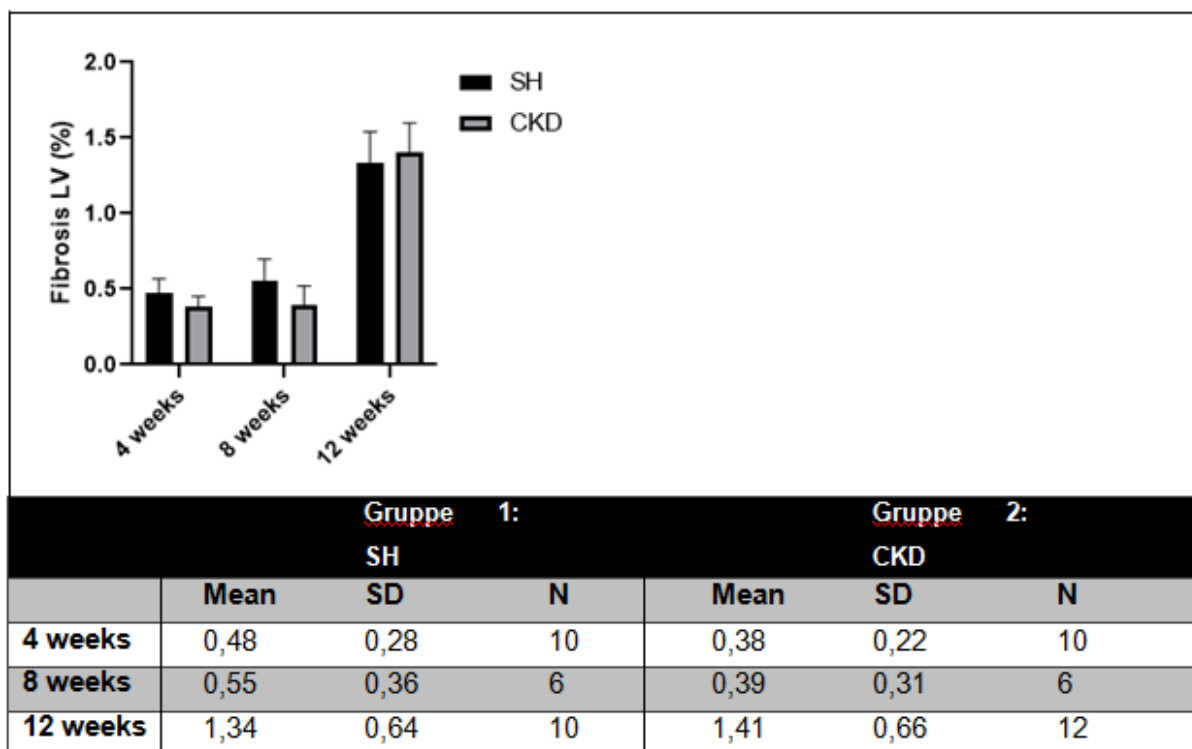


Abbildung 14: Fibroseanteil (%) Arbeitsmyokard des linken Ventrikels im Vergleich Sham und CKD. Mean = Mittelwert, SD = Standardabweichung, N = Gesamtanzahl der Mäuse

Es wurde der Fibroseanteil in % der linken Herzwand bei den CNI (engl.: CKD = chronic kidney disease) und scheinoperierten (sham) Mäusen gemessen. Diese beiden Gruppen wurden in einem Zeitverlauf von vier, acht und 12 Wochen miteinander verglichen. Die myokardiale Fibrosierung bei den scheinoperierten Mäusen lag vier Wochen nach der OP bei 0,48%, nach 12 Wochen bei 1,34%. Die CNI Mäuse hatten einen Fibrosegehalt von 0,38% vier Wochen nach der OP, 1,41% nach 12 Wochen.

Da es sich hierbei um sehr geringe Messbereiche handelt, ist dieser Versuch nicht aussagekräftig. Es ist kein signifikant erhöhter Wert einer myokardialen Fibrosierung gemessen worden und somit liegt keine im Zeitverlauf progrediente Linksherzhypertrophie vor.

4.3 Wheat germ agglutinin (WGA)

4.3.1 Histologie der Herzschnitte

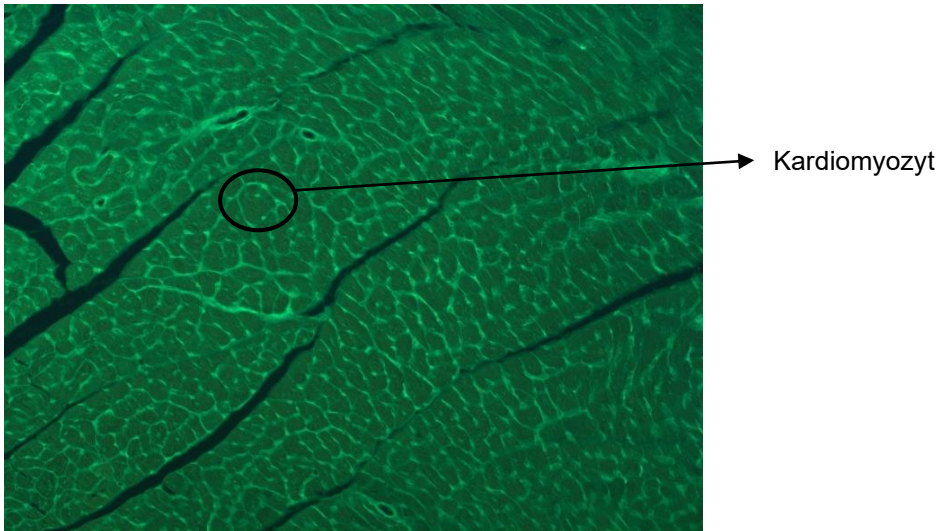


Abbildung 15: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

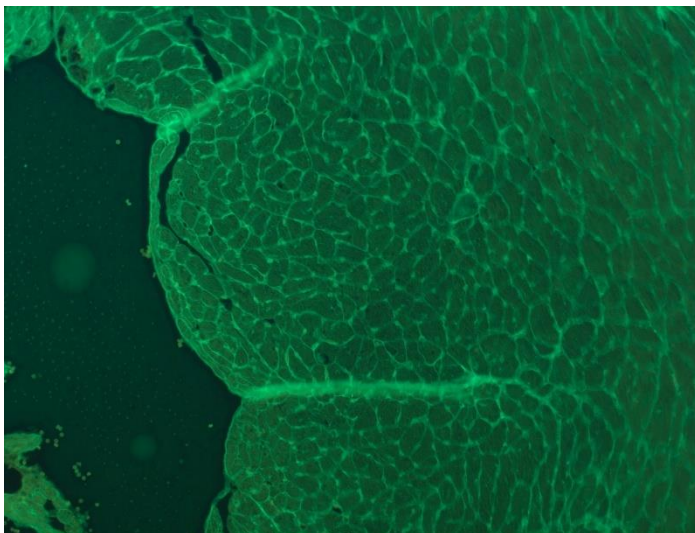


Abbildung 16: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

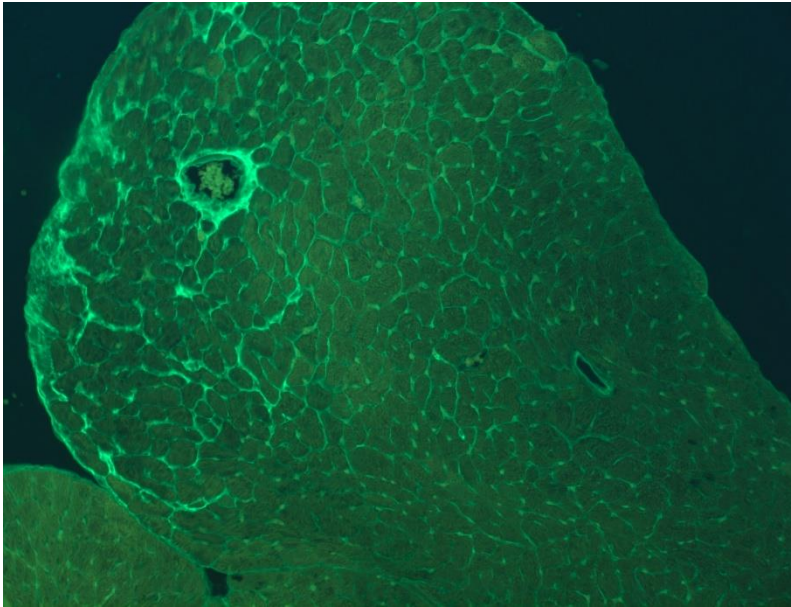


Abbildung 17: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: acht Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

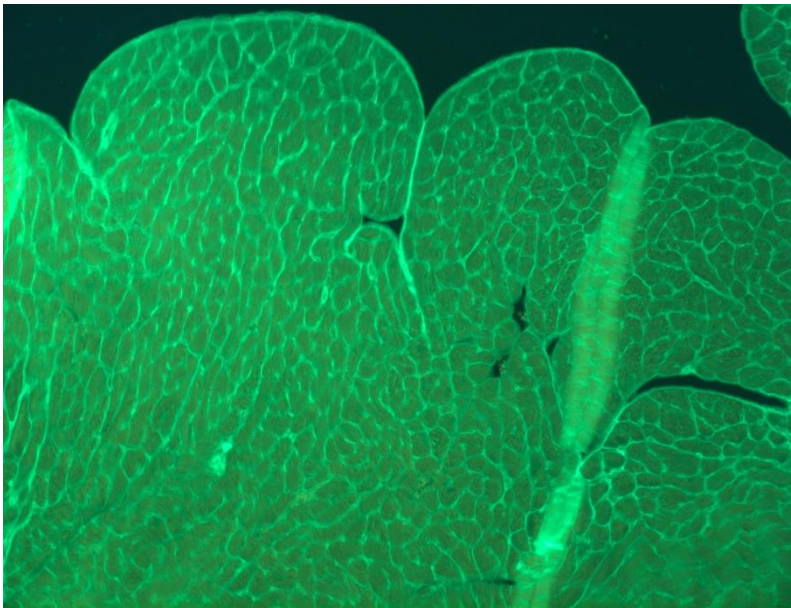


Abbildung 18: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) acht Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

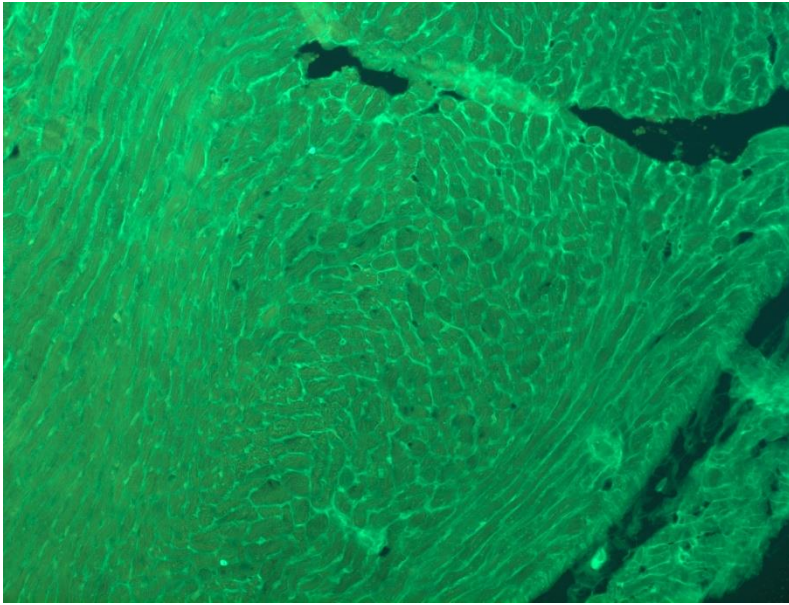


Abbildung 19: Arbeitsmyokard linker Ventrikel: Maus: 12 Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

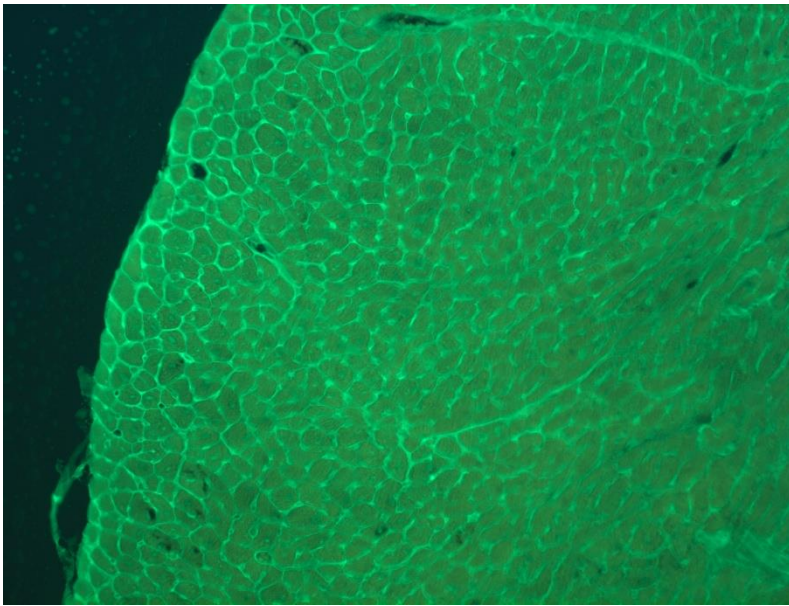


Abbildung 20: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) 12 Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach

4.3.2 Kardiomyozytengröße im Vergleich CNI und Sham

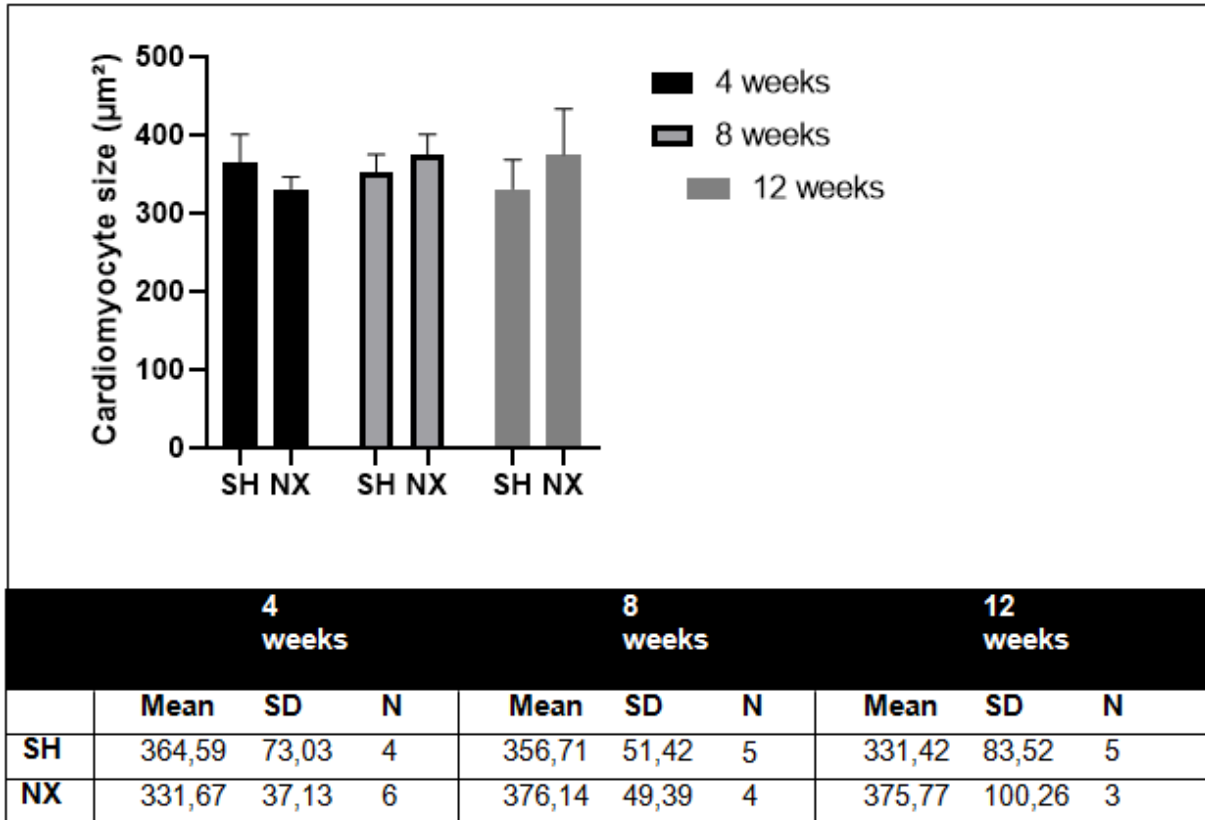


Abbildung 21: Kardiomyozytengröße (μm^2) im Vergleich SH (sham) und NX (CNI). Mean = Mittelwert, SD = Standardabweichung, N = Gesamtanzahl der Mäuse

Bei einigen CNI sowohl auch scheinoperierten Mäusen wurde die Kardiomyozytengröße der linken Herzwand in μm^2 gemessen und in einem Zeitverlauf von vier, acht und 12 Wochen dargestellt.

In diesem Versuch ist keine signifikante Veränderung der Kardiomyozytengröße festzustellen, folglich liegt keine Hypertrophie der Herzmuskelzellen vor.

5 Diskussion

Wie bereits aus einigen anderen Studien bekannt ist (Küçüköylü und Rump 2012, Di Lullo et al. 2015, Ammirati 2020), stellt die chronische Niereninsuffizienz ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko sowohl bei humanen und veterinärmedizinischen Patientien dar. Folglich steigt die Gefahr an einer Hypertonie zu erkranken und somit auch einer linksventrikulären Hypertrophie. Bisher gab es in experimentellen Mausmodellen für chronische Niereninsuffizienz zu dieser Fragestellung nur bruchstückhafte Daten. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen jedoch, dass in Folge einer 5/6 Nephrektomie über einen Zeitverlauf keine signifikanten Veränderungen im Arbeitsmyokard, weder eine vermehrte Fibrosierung noch eine Kardiomyozytenvergrößerung im Myokard des linken Ventrikels, festzustellen ist, welche eindeutige Beweise einer LVH darstellen.

Möglicherweise haben die geringe Zahl der Versuchstiere und die möglicherweise unzureichende Zeitspanne von 12 Wochen dazu beigetragen, dass kein aussagekräftiges Ergebnis bei dieser Arbeit hervorgetreten ist. Die dennoch ersichtliche minimale Zunahme an myokardialer Fibrosierung kann man mit dem zunehmenden Alter der Mäuse interpretieren, welche sich als physiologisch darstellt.

Ebenfalls bei der Diskussion der Ergebnisse zu berücksichtigen ist der neu entdeckte Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23). Wie bereits schon erwähnt haben frühere Forschungen belegt, dass erhöhte FGF23-Spiegel einen unabhängigen Risikofaktor für linksventrikuläre Hypertrophie und Mortalität bei Niereninsuffizienz darstellen (Stöhr et al. 2018). Da FGF23 in dieser Arbeit nicht explizit untersucht worden ist, könnte man in kommenden Studien diesen Wachstumsfaktor noch mehr erforschen.

Insgesamt wäre es zu empfehlen die Untersuchungen zeitlich weiter auszudehnen und die Zahl der Versuchstiere zu erhöhen, um eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen.

6 Zusammenfassung

Abschließend wurden die wichtigsten Ergebnisse dieser Diplomarbeit nochmals zusammengefasst. Die Bereitstellung der Informationen erfolgt in deutscher und englischer Sprache.

6.1 Zusammenfassung (deutsch)

Chronische Niereninsuffizienz (CNI) ist weltweit ein bedeutendes medizinisches Problem sowohl bei Tieren als auch bei uns Menschen. Sie wird häufig mit einer linkventrikulären Hypertrophie (LVH) assoziiert. In experimentellen Mausmodellen für chronische Niereninsuffizienz gibt es zu dieser Fragestellung nur bruchstückhafte Daten, die sehr vom verwendeten Modell abhängen. In der vorliegenden Arbeit wurde der "Goldstandard", die 5/6-Nephrektomie, als Modell der chronischen Niereninsuffizienz verwendet. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass 5/6-nephrektomierte Mäuse eine im Zeitverlauf progrediente Linksherzhypertrophie entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass 5/6-nephrektomierte Mäuse in einem Zeitverlauf von 12 Wochen keine fortschreitende Linksherzhypertrophie entwickeln. Es wurden keine signifikanten Veränderungen im Arbeitsmyokard, weder eine vermehrte Fibrosierung noch eine Kardiomyozytenvergrößerung im Myokard des linken Ventrikels, festgestellt und somit liegt keine linksventrikuläre Hypertrophie vor.

Zusammenfassend wurde die Hypothese, dass 5/6-nephrektomierte Mäuse eine im Zeitverlauf progrediente Linksherzhypertrophie entwickeln, nicht bestätigt.

6.2 Summary (english)

Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide significant medical problem in animals as well as humans. It is often associated with left ventricular hypertrophy (LVH). There are fragmentary data on this issue in experimental mouse models of chronic kidney disease, which are highly dependent on the model which is used. In the present work, the "gold standard", 5/6 nephrectomy, was used as a model for chronic kidney disease. The hypothesis of this work is that 5/6-nephrectomized mice develop progressive left ventricular hypertrophy over time.

The results of this work indicate that 5/6-nephrectomized mice do not develop progressive left ventricular hypertrophy over a 12-week time course. No significant changes were detected in the myocardium, neither increased fibrosis nor cardiomyocyte enlargement in the myocardium of the left ventricle, and therefore there is no left ventricular hypertrophy present.

In conclusion, the hypothesis that 5/6-nephrectomized mice develop progressive left ventricular hypertrophy over time was not confirmed.

7 Literaturverzeichnis

Ammirati A.L. 2020. Chronic Kidney Disease. *Revista da Associação Médica Brasileira*, (6(Suppl 1)): 3–9.

Behrends J.C., Bischofberger J., Deutzmann R., Ehmke H., Frings S., Grissmer S., Hoth M., Kurtz A., Leipziger J., Müller F., Pedain C., Rettig J., Wagner C., Wischmeyer E. 2010. *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Carracedo J., Alique M., Vida C., Bodega G., Ceprián N., Morales E., Praga M., Sequera P., Ramírez R. 2020. Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Patients With Chronic Kidney Disease: A Process Related to Accelerated Senescence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, (Volume 8): 185.

Couto C.G., Nelson R.W. 2010. *Innere Medizin der Kleintiere*. Zweite. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer, 1564.

Di Lullo L., Gorini A., Russo D., Santoboni A., Ronco C. 2015. Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med*, (5(4)): 254–266.

Eckhardt K.U., Coresh J., Devuyst O., Johnson R.J., Köttgen A., Levey A. 2013. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*, (382(9887)): 158–169.

Engelhardt W., Breves G., Diener M., Gäbel G. 2015. *Physiologie der Haustiere*. Fünfte. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag.

Kovesdy C.D., Quarles L.D. 2013. The Role of Fibroblast Growth Factor-23 in Cardiorenal Syndrome. *Nephron Clin Pract*, (123(3-4)): 194–201.

Kücükköylü S., Rump L.C. 2012. Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. *Der Internist*, (53): 791–801.

Middleto R.J., Parfrey P.S., Foley R.N. 2001. Left Ventricular Hypertrophy in the Renal Patient. *Jasn*, (12(5)): 1079–1084.

Rademacher S. 2010. Genetik der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose bei salzsensitiver experimenteller Hypertonie im Rattenmodell. Berlin: Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Simonini C. 2014. Spermidin und kardiales Remodeling nach erhöhter Drucklast. Medizinischen Universität Graz.

Stöhr R., Schuh A., Heine G.H., Brandenburg V. 2018. FGF23 in Cardiovascular Disease: Innocent Bystander or Active Mediator? *Front Endocrinol*, (9): 422.

Yang H.C., Zuo Y., Fogo A.B. 2010. Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*, (7(1-2)): 13–19.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau der Niere	7
Abbildung 2: Aufbau eines Nephrons.....	7
Abbildung 3: Einfluss der Nierenfunktion auf wesentliche homöostatische Prozesse.	10
Abbildung 4: Die verschiedenen Ventrikelformen bei Hypertrophie.....	15
Abbildung 5: Darstellung des Arbeitsplatzes	18
Abbildung 6: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 12,5fach	21
Abbildung 7: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 200fach	21
Abbildung 8: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 12,5fach.....	22
Abbildung 9: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: HE; Originalvergrößerung: 200fach.....	22
Abbildung 10: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 12,5fach.....	23
Abbildung 11: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 200fach	23
Abbildung 12: Herzquerschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 12,5fach.....	24
Abbildung 13: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach OP. Färbung: PSR; Originalvergrößerung: 200fach	24
Abbildung 14: Fibroseanteil (%) Arbeitsmyokard des linken Ventrikels im Vergleich Sham und CKD.....	25

Abbildung 15: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: vier Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach	26
Abbildung 16: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) vier Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach	26
Abbildung 17: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: acht Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach	27
Abbildung 18: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) acht Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach	27
Abbildung 19: Arbeitsmyokard linker Ventrikel: Maus: 12 Wochen nach Induktion der CNI. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach.....	28
Abbildung 20: Arbeitsmyokard linker Ventrikel. Maus: Kontrollgruppe (sham) 12 Wochen nach der OP. Färbung: WGA; Originalvergrößerung: 200fach	28
Abbildung 21: Kardiomyozytengröße (μm^2) im Vergleich SH (sham) und NX (CNI)	29

9 Anhang

9.1 Protokoll H&E-Färbung

Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie

H&E-Färbung von PARAFFINSCHNITTEN (wässriges Eosin gelblich)

ENTPARAFFINIEREN:

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

FÄRBUNG:

• Hämatoxylin (Mayer)	3-4 min.
• fließendes tap H ₂ O	10 min.
• 1% wässriges Eosin gelblich (auf 200 ml 2 Tropfen Eisessig zugeben!!!)	2-5 min.
• 70% EtOH	2-3 x dippert
• 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
Kalialsun (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.

Die Lösung muß filtriert werden. Gut verschlossen ist sie lange haltbar.

1% wässriges Eosin gelblich:

Eosin gelblich	10 g
Aqua dest.	1000 ml

Gut rühren und vor Gebrauch filtrieren. Gut verschlossen ist sie lange haltbar. Vor Gebrauch auf eine Färbeküvette (200ml) 2-3 Tropfen Eisessig zugeben.

9.2 Protokoll PSR-Färbung

Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie

PICRO-SIRIUS-RED-Färbung von PARAFFINSCHNITTEN (allgemein)

Färbung von Kollagen im Gewebe: Kollagenfasern rot, Muskelfasern und Zytoplasma gelb;
im polarisierten Licht Kollagenmachweise – große Fibrillen gelb, kleine grün

ENTPARAFFINIEREN:

- Xylol I 15 min.
- Xylol II 15 min.
- Isopropanol 5 min.
- 70% EtOH 5 min.
- 40% EtOH 5 min.
- dH₂O 2,5 min.
- dH₂O 2,5 min.

FÄRBUNG:

- Färbung mit Picro-Sirius-Red Solution: (lichtgeschützt wegen Polarisation!)
 - Herzen 60 min.
 - Nieren 90 min.

Waschschritte:

- Acidified Water I 3 min (lichtgeschützt!)
- Acidified Water II 3 min. (lichtgeschützt!)
 - den größten Teil des Wassers von den OTs entfernen, indem man die Abschnitte kräftig schüttelt und händisch trocknet um eine gute Färbung zu erhalten! Sonst rot und pink!
- Isopropanol I 3 min.
- Isopropanol II 3 min.
- Xylol I 7 min.
- Xylol II 7 min.

EINDECKEN:

- mit DePeX
- mit Alufolio abdecken (wegen Polarisation!)

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

9.3 Protokoll WGA-Färbung

Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie

WGA-Färbung von PARAFFINSCHNITTEN

ENTPARAFFINIEREN:

- | | | |
|---------------------|----------|------------------|
| • Xylol I | 15 min. | |
| • Xylol II | 15 min. | SCHNITTE MÜSSEN |
| • Isopropanol | 5 min. | INNERHALB VON 14 |
| • 70% EtOH | 5 min. | TAGEN |
| • 40% EtOH | 5 min. | MIKROSKOPIERT |
| • dH ₂ O | 2,5 min. | WERDEN! |
| • dH ₂ O | 2,5 min. | |

FÄRBUNG:

Inkubations-Lösungen mit Alufolie vor Licht schützen (wegen Polarisation!)

- waschen in 1x PBS 5 min.
100ml 10x PBS + 900ml a.d.
- inkubieren in Edelstahlkammer bei RT 60 min.
mit WGA - Wheat Germ Agglutinin
(Verdünnung 1:200) je Sektion 100µl = 0,1ml

o z.B.: 1990µl 1x PBS + 10µl WGA = 2000µl Lösung
3990µl + 20µl = 4000µl Lösung => doppelte nehmen!

Waschen:

- 1x PBS I 5 min.
- 1x PBS II 5 min.
- Inkubieren mit DAPI 8 min.

(Verdünnung 1:1.000)

o z.B.: 2ml 1x PBS + 2µl DAPI = 2002µl Lösung
4µl + 4µl = 8004µl Lösung => doppelte nehmen!
- 4.000µl

Waschen:

- 1x PBS III 5 min.
- 1x PBS IV 5 min.

EINDECKEN:

- mit Fluoromount
- mit Alufolie abdecken (wegen Polarisation!)

WGA = Lectin from Triticum vulgaris (wheat) FITC conjugate, lyophilized powder

Sigma L4895-5MG (1*5mg)