

Aus dem Lehrstuhl
für Molekulare und Zelluläre Anatomie
Prof. Dr. Silke Härteis
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Kultivierung von Mäusenierenschnitten
in einem 3D-*in-vivo*-Modell

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Victoria Haller

2025

Aus dem Lehrstuhl
für Molekulare und Zelluläre Anatomie
Prof. Dr. Silke Härteis
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Kultivierung von Mäusenierenschnitten
in einem 3D-*in-vivo*-Modell

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Victoria Haller

2025

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Silke Härteis

2. Berichterstatter:

PD. Dr. Katharina Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

17.02.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Bedeutung der Niere für den Organismus	5
1.2	Aufbau und Funktion der Niere	7
1.2.1	Makroskopischer Aufbau	7
1.2.2	Mikroskopischer Aufbau mit physiologischen Grundlagen	8
1.2.3	Anatomie der Niere von Maus und Mensch im Vergleich	13
1.3	Untersuchungsmöglichkeiten am Nierengewebe	14
1.4	3D- <i>in-vivo</i> -Modell als alternative Untersuchungsmethode	17
1.4.1	Allgemeines	17
1.4.2	Entwicklung und Morphologie	17
1.4.3	Funktion der CAM	18
1.4.4	Anwendung als Untersuchungsmodell	18
1.4.5	Einsatz des 3D- <i>in-vivo</i> -Modells in der Nierenforschung	19
1.5	Fragestellung	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Chemikalien, Medien und Antikörper	22
2.1.2	Puffer und Lösungen	22
2.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4	Software	24
2.1.5	Versuchstiere	24
2.2	Experimente im CAM-Modell	25
2.2.1	Vorbereitung der Eier	25
2.2.2	Inokulation der Nierenschnitte	26
2.2.3	Beobachtungszeitraum	27
2.2.4	Versuchsende	27
2.3	Versuchsreihen	28
2.4	Histologische Verarbeitung	30
2.4.1	Herstellung von Paraffinschnitten	30
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.4.3	Weitere Färbungen und Analysen	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Veröffentlichung	33
3.2	Auswertung	33
3.2.1	Makroskopische Auswertung	33
3.2.2	Mikroskopische Auswertung	34
3.2.3	Statistische Analyse	37

3.3	Makroskopische Beurteilung der Versuchsbedingungen	38
3.4	Vergleich der verschiedenen Abdeckungen nach 7 Tagen	43
3.4.1	Glomeruläre Schädigung nach 7 Tagen	44
3.4.2	Tubulointerstitielle Schädigung nach 7 Tagen	47
3.4.3	CAM-Übergang nach 7 Tagen	50
3.4.4	Oberflächliche Schädigung nach 7 Tagen	52
3.5	Zeitverlauf ohne Abdeckung	54
3.5.1	Glomeruläre Schädigung im Zeitverlauf	54
3.6	Tubulointerstitielle Schädigung im Zeitverlauf	57
3.6.1	CAM-Übergang im Zeitverlauf	61
3.6.2	Oberflächliche Schädigung im Zeitverlauf	63
3.6.3	Immunhistochemische Färbungen (CD31 und PCNA)	64
3.6.4	Transmissionselektronenmikroskopie	66
3.7	Vergleich der Abdeckungen über 5 und 7 Tage	68
3.7.1	Glomeruläre Schädigung nach 5 und 7 Tagen	68
3.7.2	Tubulointerstitielle Schädigung nach 5 und 7 Tagen	70
3.7.3	CAM-Übergang nach 5 und 7 Tagen	72
3.7.4	Oberflächliche Schädigung nach 5 und 7 Tagen	73
3.8	Optimierung der Versuchsbedingungen	74
3.8.1	Wahl des Mediums	74
3.8.2	Kultivierung mit Silikonring	74
4	Diskussion	75
4.1	Allgemeine Beurteilung der Ergebnisse	76
4.2	Bewertung der Abdeckungen nach 7 Tagen Kultivierung	78
4.3	Veränderungen über den Zeitverlauf einer Woche	80
4.4	Weitere Modellierung der Versuchsbedingungen	82
4.5	Zusammenfassung und Optimierungsvorschläge	82
4.6	Ausblick auf weitere Forschungsanwendungen	84
5	Zusammenfassung	86
6	Anhang	87
6.1	Tabellenverzeichnis	87
6.2	Abbildungsverzeichnis	87
7	Literaturverzeichnis	89
8	Erklärung zur Dissertation	97
9	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Niere für den Organismus

Als exokrin und endokrin wirksames Stoffwechselorgan nimmt die Niere eine zentrale Rolle im Organismus ein, indem sie für die Harnbildung zuständig ist und so als Ausscheidungsorgan dient (1). Um ihrer Funktion nachkommen zu können, ist die Niere sehr gut durchblutet, etwa 25 % des Herzzeitvolumens durchströmt das Organ, sodass das gesamte Blutvolumen des Körpers mehrmals täglich renal gereinigt wird. Die Nierenkörperchen verfügen über eine glomeruläre Filtrationsleistung von ca. 120 ml Blut pro Minute, wodurch ungefähr 170 l Primärharn pro Tag gebildet werden (2). Im nachgeschalteten Tubulussystem werden vom Organismus benötigte Stoffe und der größte Teil des Wassers und der Elektrolyte über spezifische Kanäle und Transporter rückresorbiert und der Harn auf ein deutlich geringeres Endvolumen von 1–1,5 l Urin konzentriert (1). Auf diese Weise dient die Niere der Ausscheidung harnpflichtiger Abfall- und Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Harnstoff und Ammoniak sowie körperfremder Stoffe wie Xenobiotika (3).

Darüber hinaus spielt die Niere eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Blutvolumens und des arteriellen Blutdrucks. Über die Wasser- und Natriumchlorid-Ausscheidung werden das Volumen und die Elektrolytverhältnisse zwischen Intra- und Extrazellulärraum konstant gehalten. Dabei dient das sog. „Renin-Angiotensin-Aldosteron-System“ (RAAS) als ein hormoneller Steuerungsmechanismus des Blutdrucks. Bei Abfall des Blutdrucks kann über die Freisetzung verschiedener Hormone des RAAS und durch ihre Wirkung auf die Kanäle im Tubulussystem gegengesteuert werden, indem sie die Resorption von Wasser und Natriumionen anpassen und zusätzlich zu einer Vasokonstriktion führen, um insgesamt eine Blutdrucksteigerung hervorzurufen (4).

Neben der Homöostase im Natriumhaushalt reguliert die Niere auch die Konzentration anderer Elektrolyte wie z. B. des Kaliums sowie den Säuren-Basen-Haushalt über die Ausscheidung von Protonen und Bicarbonat. Zudem wirkt die Niere durch ihren Einfluss auf die Konzentration von Phosphat und Calcium und durch die Bildung des Hormons Calcitriol auf die Mineralisierung des Knochens. Ebenfalls renal synthetisiert wird das Hormon Erythropoetin, das die Erythropoese im Knochenmark stimuliert (3).

Aus diesen zahlreichen Funktionen der Niere leitet sich ab, welche Symptome auftreten, wenn das Organ erkrankt und seine Funktion zunehmend ausfällt. Patienten mit fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz leiden oftmals an Ödemen, arterieller Hypertonie, Elektrolytstörungen wie z. B. einer Hyperkaliämie und einer metabolischen Azidose. Endokrine Störungen wie eine renale Osteopathie und renale Anämie können ebenso auftreten wie Folgen einer Urämie, beispielsweise eine urämische Perikarditis oder eine Störung des Zentralnervensystems bis hin zum Koma (4).

Zu solch einem Vollbild einer chronischen Niereninsuffizienz kann neben den klassischen Volkskrankheiten Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie auch die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) führen, eine der häufigsten Erbkrankheiten mit einer Prävalenz von etwa 1:1000 (5). Mutationen im PKD1- oder PKD2-Gen führen bei diesem Krankheitsbild zu einer fehlerhaften Expression der kodierten Proteine Polycystin-1 bzw. -2, die in den Nierentubuli einen Komplex bilden und als Signalproteine eine wichtige Rolle in der Reifung und Differenzierung von Nierenepithelzellen spielen. In der Folge kommt es zu bilateraler multipler Zystenbildung und dadurch zur Einschränkung der Nierenfunktion (6). Im Verlauf der Krankheit besteht bei einem Großteil der Patienten das Risiko, aufgrund eines terminalen Nierenversagens dialysepflichtig zu werden. Da die derzeitigen Therapiemöglichkeiten nur begrenzt wirksam und mit vielen Nebenwirkungen verbunden sind, ist die Nierentransplantation oft die letzte Option (6). Zur ADPKD ist bisher bekannt, dass es im Krankheitsverlauf durch Erweiterung der Sammelrohre und Epithelzellproliferation zur Bildung von Zysten, also flüssigkeitsgefüllter Hohlräume, kommt. Das Zystenwachstum erfolgt durch ständige Zellproliferation und Flüssigkeitsansammlung, die in erster Linie durch die Sekretion von Chlorid gesteuert wird (7). Auch wenn der zugrundeliegende komplexe molekulare Mechanismus zunehmend untersucht wird und sich auf molekularer Ebene immer mehr mögliche therapeutische Angriffspunkte abzeichnen, müssen jedoch potenzielle Medikamente ebenso wie auch die Pathophysiologie der Erkrankung noch besser untersucht werden, insbesondere auch an menschlichem Nierengewebe, um einer klinischen Anwendung näher zu kommen und die Prognose betroffener Patienten verbessern zu können (8).

1.2 Aufbau und Funktion der Niere

1.2.1 Makroskopischer Aufbau

Bei der Niere handelt es sich um ein bohnenförmiges, paarig angelegtes Organ, das retroperitoneal im oberen Mittelbauch liegt. Am medial gelegenen Hilum renale münden alle zu- und abführenden Leitungsbahnen, die Arteria renalis zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, die Vena renalis zur Drainage des sauerstoffarmen Blutes und der Ureter zur Ableitung des renal gebildeten Harns in die Harnblase. Die nervale Versorgung erfolgt über sympathische postganglionäre Fasern des Plexus coeliacus sowie parasympathische Fasern des Nervus vagus (9). Das Organ ist von mehreren Kapseln umhüllt: Direkt um die Niere befindet sich eine derbe bindegewebige Kapsel (Capsula fibrosa), gefolgt von einer Fettschicht (Capsula adiposa), die die kranial gelegenen Nebennieren miteinschließt und umgeben ist von der Fascia renalis (10).

Makroskopisch lässt sich die Niere in eine außen gelegene Nierenrinde (Cortex renalis) und ein innen gelegenes Nierenmark (Medulla renalis) untergliedern (10). Aufgebaut ist das Mark aus Markpyramiden (Pyramis renalis), die an ihrer Spitze (Papille) in ein Kelchsystem münden, welches das Nierenbecken (Pelvis renalis) bildet und den Ursprung des Ureters darstellt. Von der Basis einer Markpyramide reichen ca. 400–500 Markstrahlen (Pars radiata) nach außen in die Rinde und unterteilen diese in ein sog. Rindenlabyrinth (1). Die humane Niere gliedert sich in 7–9 Lappen mit jeweils einer Markpyramide und weist damit eine sog. multipapilläre Form auf (11). Den schematischen Aufbau einer humanen Niere zeigt **Abb. 1**.

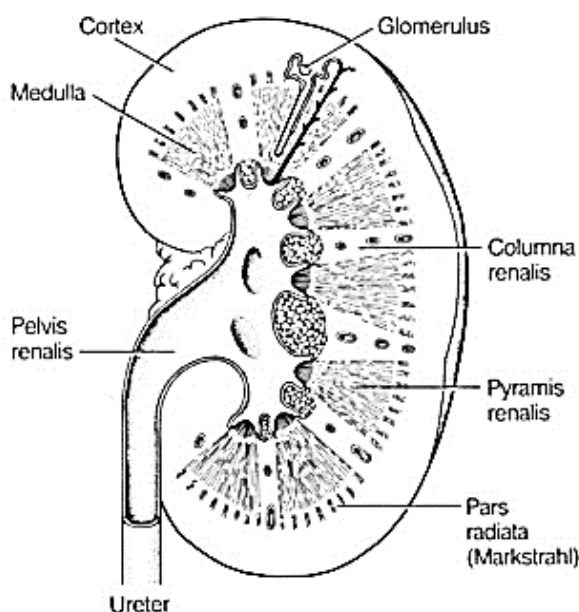


Abb. 1: Schema einer humanen Niere

Gezeigt ist der grobe Aufbau einer multipapillären humanen Niere im Längsschnitt mit Rinde (Cortex), Mark (Medulla) und Nierenbeckenkelchsystem (Pelvis renalis) (12).

1.2.2 Mikroskopischer Aufbau mit physiologischen Grundlagen

Jede humane Niere umfasst ca. 1–1,5 Millionen Nephrone, die als funktionelle Einheit aus einem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und einem nachgeschalteten Tubulussystem bestehen (1). An die Nephrone schließt sich ein Sammelrohrsystem an, aus dem im Bereich der Nierenpapille die Nierenkelche hervorgehen, die in ihrer Gesamtheit das Nierenbecken bilden und in den Ureter münden (10).

Zu dem im Rindenlabyrinth gelegenen Nierenkörperchen gehört der Glomerulus, ein Blutkapillarknäuel, der von der Bowmankapsel mit einem parietalen Blatt aus einschichtigem Plattenepithel und viszeralem Blatt, den Podozyten, umgeben ist. Zwischen den Blättern befindet sich der Kapselraum, der als Filtrationsraum dient (11). Ein Glomerulus ist eingebettet im intraglomerulären Mesangium aus Mesangialzellen und mesangialer Matrix, das das Gefäßknäuel gegen den hohen intrakapillären Druck stabilisiert (1). In Verbindung dazu steht das extraglomeruläre Mesangium, das gemeinsam mit den granulierten juxtaglomerulären Zellen in der Media des Vas afferens, die für die Reninproduktion zuständig und sympathisch innerviert sind, und der Macula densa, einer Kontaktstelle zur Pars recta des distalen Tubulus, den sog. juxtaglomerulären Apparat bildet. Über das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten spielt er eine wichtige Rolle in der Regulation der glomerulären Filtration und damit des Extrazellulärvolumens und des Blutdrucks (1). Eine schematische Darstellung eines Nierenkörperchens mit seinen Bestandteilen zeigt **Abb. 2**.

Die Wände der mehr als 20 Kapillarschlingen des Kapillarknäuels am Übergang zwischen Glomerulus und Kapselraum weisen ein dünnes Endothel mit ca. 70–100 nm breiten Fenestrationen auf (1). Dem Endothel anliegend findet sich die etwa 200–300 nm dicke glomeruläre Basalmembran, die durch Verschmelzung der Basallaminae der Endothelzellen und der Podozyten entsteht. Sie wird in eine zu den Endothelzellen gerichtete Lamina rara interna, eine Lamina densa in der Mitte und eine Lamina rara externa unterteilt, die zu den Podozyten gehört (11). Die Lamina densa besteht überwiegend aus Kollagen IV, Laminin und Fibronektin und dient als mechanische Komponente des Filters, während die Laminae rarae u. a. aus negativ geladenen Heparansulfaten bestehen und durch ihre elektrostatische Abstoßung die Filtration polyanionischer Plasmaproteine verhindern (10). Bei den Podozyten handelt es sich um ausdifferenzierte Zellen, die nicht mehr teilungsfähig sind und als verzweigte

Deckzellen mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen die Kapillaren umgreifen. Dort befinden sich kontraktile Filamente, durch die die Durchlässigkeit der Filterbarriere reguliert werden kann (1). Im schmalen interzellulären Spaltraum von ca. 20–30 nm zwischen ihren Fortsätzen bilden sie etwa 5 nm dicke Schlitzmembranen aus, die aus Glykoproteinen bestehen und Poren aufweisen (11).

Gemeinsam bilden Kapillarendothel, glomeruläre Basalmembran und die Podozyten die Filtrationsbarriere des Nierenkörperchens (11). An dieser Blut-Harn-Schranke werden Stoffe nach ihrer Größe filtriert: Wasser und darin gelöste Ionen, Zucker, Aminosäuren und organische Moleküle werden bis zu einem Molekulargewicht von 5 kDa bzw. einer Molekülgröße bis etwa 2,5 nm, frei filtriert, mit steigender Größe nimmt die Filtrationsleistung ab. Aufgrund ihrer Ladung können negativ geladene Moleküle die Barriere schlechter durchdringen als positiv geladene (1). Als Triebkraft für die Filtration dient der hohe hydrostatische Druck von ungefähr 50 mmHg in den Kapillaren (1, 11). Während das gefilterte Blut über am Gefäßpol abfließt, gelangt der Primärharn über den Harnpol in das anschließende Kanalsystem (10).

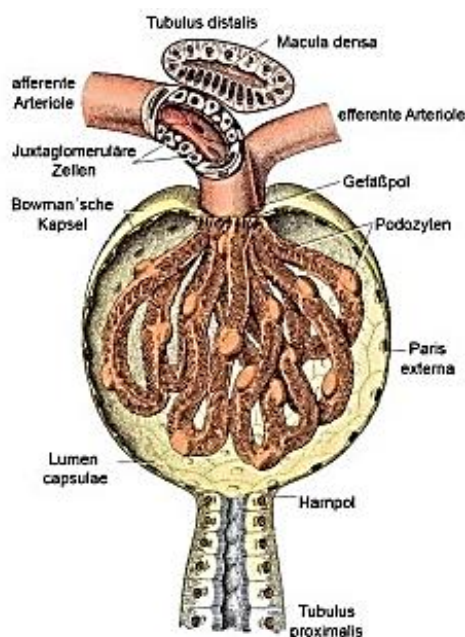


Abb. 2: Schema eines Nierenkörperchens

Oben am Gefäßpol fließt das Blut über die afferente Arteriole in das Kapillarnäuel. Durch Filtration an der Blut-Harn-Schranke wird im glomerulären Kapselraum der Primärharn gebildet, der über den Harnpol in den proximalen Tubulus abfließt (12).

An das Nierenkörperchen schließt sich ein ausgedehntes Tubulussystem an, das sich aus mehreren Abschnitten zusammensetzt, die morphologische und funktionelle Unterschiede aufweisen. Auf den proximalen Tubulus folgen Intermediärtubulus und distaler Tubulus, der über einen Verbindungstubulus in ein Sammelrohr mündet (1).

Am Harnpol des Nierenkörperchens beginnt der proximale Tubulus mit der Pars convoluta im Rindenlabyrinth und der anschließenden Pars recta, die mit dem Intermediärtubulus und der Pars recta des distalen Tubulus die Henle-Schleife bildet (1). Die Wand des proximalen Tubulus weist ein einschichtig kubisch bis niedrig-prismatisches Epithel auf, dem ein ausgeprägter Bürstensaum aus dicht stehenden Mikrovilli mit einer hohen Glykokalix anliegt (11). Die Zellkerne sind groß, rund und euchromatinreich (1). Durch das zahlreiche Vorkommen säulenartig angeordneter Mitochondrien erscheint das Epithel eosinophil (1, 11). Apikal befinden sich zahlreiche Vesikel, die die intensiven Resorptionsvorgänge mittels Endozytose widerspiegeln. Von proximal nach distal nimmt die Funktionsleistung des proximalen Tubulus ab, was sich strukturell zeigt, da in der Pars recta das Epithel niedriger ist, der Bürstensaum weniger dicht steht und die Zellen weniger Organellen aufweisen (11).

Der Intermediärtubulus besteht meist aus einem absteigenden und einem aufsteigenden Anteil und zeichnet sich durch einen geringeren Lumendurchmesser und ein flacheres einschichtiges Epithel als der proximale Tubulus aus. Die Zellen weisen nur wenige Organellen und keinen Bürstensaum auf, die Zellkerne wölben sich teilweise ins Lumen vor (11). Typischerweise ist der absteigende Schenkel durch das Vorkommen von Aquaporinen ebenso wie der proximale Tubulus wasserdurchlässig, während der aufsteigende Schenkel keine Aquaporine aufweist und damit weitestgehend wasserundurchlässig ist (4).

Der sich anschließende distale Tubulus setzt sich wiederum aus einer Pars recta und einer Pars convoluta zusammen und ähnelt vom Bauprinzip her dem proximalen Tubulus, jedoch mit schmalerem Lumen und flacherem Epithel (11). Die Zellen besitzen weder Endozytosevesikel noch einen Bürstensaum, lediglich einige Mikrovilli sind nachweisbar (1). Die Tight junctions zwischen den Zellen sind sehr dicht und in der Zellmembran kommen keine Aquaporine vor, wodurch der Tubulusabschnitt wasserundurchlässig ist (4).

Im Verlauf des Tubulussystems werden etwa 99 % des filtrierten Wassers und der darin gelösten Ionen, Zucker, Aminosäuren und Proteine des glomerulären Ultrafiltrats rückresorbiert, der Hauptteil davon im proximalen Tubulus. Die Resorption erfolgt über passive, primär und sekundär aktive Transportmechanismen, die Mitochondrien liefern die notwendige Energie, u. a. für die basolateral gelegene $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (11). Besonders im Symport mit Natriumionen können so zahlreiche Substanzen wie Glukose, Aminosäuren und Ionen wie z. B. Natrium, Kalium, Calcium und Bikarbonat aus dem Harn in die Zelle transportiert werden. Wasser wird sowohl transzellulär über Aquaporine als auch parazellulär durch die undichten Tight junctions des proximalen Tubulus entlang des osmotischen Druckgefälles resorbiert und zieht dabei gelöste Ionen entlang ihres elektrischen Gradienten mit (4, 13). Da im Gegensatz dazu im distalen Tubulus kein Wasser nachströmen kann, wird der Harn hier hypoton (11).

Die Wiederaufnahme von Proteinen, die im Ultrafiltrat nur in minimaler Konzentration vorkommen, erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose und ermöglicht eine Verwertung der Aminosäuren (1). Neben den Resorptionsvorgängen gibt es auch sekretorische Prozesse, durch die organische Säuren wie Oxalat, organische Anionen wie Atropin und Xenobiotika wie Penicillin ausgeschieden werden (11).

Insgesamt wird der Harn von ca. 170 l Primärharn auf 1–1,5 l Endharn konzentriert, so dass harnpflichtige Substanzen wie z. B. Harnstoff und Ammoniak volumensparend ausgeschieden werden können (1, 2). Die Pars recta des distalen Tubulus bildet dabei einen entscheidenden Teil der Henle-Schleife, deren Abschnitte, ebenso wie die Vasa recta, gegenläufig angeordnet sind, aber einen Stoffaustausch ermöglichen und ein Gegenstromaustauschsystem bilden. Durch die Wasserundurchlässigkeit der Pars recta des distalen Tubulus bei gleichzeitiger Natriumchlorid-Resorption wird ein osmotischer Gradient zwischen Tubuluslumen, Interstitium und Blut etabliert, der als Voraussetzung für die Konzentrierung des Harns dient (11). Die Konzentrationsverhältnisse von Harnstoff zwischen den verschiedenen Kompartimenten spielen dabei neben Natriumchlorid eine ebenso bedeutende Rolle für die Harnkonzentrierung (2).

Als Verknüpfung mehrerer distaler Tubuli mit einem Sammelrohr dient der Verbindungstubulus, der funktionell und histologisch dem Sammelrohr ähnelt. Die Transportvorgänge werden hormonell beeinflusst, wobei durch Wasser- und Natriumresorption der Harn isoton wird (1, 11). Über jeweils etwa 10 Verbindungstubuli fließt der Harn in

kortikale Sammelrohre, die in den Markstrahlen verlaufen. Im Nierenmark entstehen daraus in Richtung Nierenpapille medulläre Sammelrohre und schließlich als Endstücke papilläre Sammelrohre, von denen pro humane Niere etwa 200–700 an den Spitzen der Nierenpapillen in die Nierenkelche münden, die gemeinsam das Nierenbecken darstellen und den Harn in den Ureter leiten (11).

Das Epithel der Sammelrohre ist je nach Lokalisation kubisch oder hochprismatisch, wobei die Epithelhöhe wie auch der Lumendurchmesser Richtung Papille zunehmen (1). Die Zellen sind durch das Vorkommen dichter Tight junctions vor einem parazellulären Wassertransport abgedichtet. Es kommen zwei Zelltypen vor: Die Hauptzellen stellen den größten Teil der Epithelzellen dar und sind für die Resorption von Natrium und Wasser zuständig. Die Schaltzellen sind mitochondrienreicher und über die Sekretion von Protonen oder Bicarbonationen an der Regulation des Säuren-Basenhaushalts beteiligt (11). Insgesamt dienen die Prozesse in den Sammelrohren der abschließenden Feinregulation der Salz- und Wasserausscheidung, um bei Veränderungen von Volumen und Elektrolytverhältnissen des Extrazellularraums den Blutdruck durch hormonelle Steuerung der Resorptionsvorgänge konstant zu halten (1).

Das Interstitium füllt den Raum zwischen den Nephronen und Sammelrohren und umfasst neben einem bindegewebigen Teil mit wenigen Kollagenfibrillen und wasserreichen Proteoglykanen einen zellulären Anteil. Spezielle Fibroblasten, die den Tubuli als peritubuläre Zellen außen angelagert sind, sind endokrin wirksam und produzieren Erythropoetin, das im Knochenmark die Erythropoese stimuliert. Außerdem bilden sie mit Prostaglandinen und Bradykinin Faktoren, die an der Regulation der Nierendurchblutung beteiligt sind (11).

1.2.3 Anatomie der Niere von Maus und Mensch im Vergleich

Grundsätzlich ähneln sich Säugetiere in der Physiologie ihrer Organe. So stimmen Aufbau und Funktion der Niere einer adulten Maus weitestgehend mit den bereits beschriebenen Verhältnissen in einer humanen Niere überein (14). In **Abb. 3** ist ein Vergleich des histologischen Aufbaus zwischen muriner und humaner Niere gezeigt.

Ein auffälliger Unterschied ergibt sich in der makroskopischen Gliederung des Organs: Während die humane Niere eine sog. multipapilläre Form mit mehreren Lappen und Markpyramiden aufweist, ist die Niere kleinerer Säuger wie z. B. einer Maus unipapillär, also aus nur einer Markpyramide bestehend, aufgebaut (11). Anders als die einzelnen Markpyramiden beim Menschen münden die Sammelrohre der Mausniere an der Spitze der Nierenpapille nicht in ein Kelchsystem, sondern direkt in das Nierenbecken (14). Die histologische Zoneneinteilung der Niere in eine Rinde mit einer schmalen, glomerulusfreien subkapsulären Zone, dem Rindenlabyrinth sowie Markstrahlen und einem Mark mit einer Außenzone und Innenzone entspricht der Gliederung der humanen Niere (14).

Die Spezies unterscheiden sich in der Anzahl der Nephronen, bei der Maus sind es ca. 14.000 und damit weniger als beim Menschen. Die Glomeruli der Mausniere haben dabei mit durchschnittlich 73 μm einen deutlich kleineren Durchmesser als in der menschlichen Niere mit 200 μm . Diese sind anders als beim Menschen nicht immer von einem platten parietalen Blatt der Bowman-Kapsel umgeben, bei männlichen Mäusen kann das Epithel auch kubisch geformt sein, wobei die Ausprägung testosteronabhängig ist (14). Die glomeruläre Basalmembran ist in der Mausniere nur 80–200 nm dick, da im Vergleich zur humanen, ca. 200–300 nm dicken Basalmembran besonders die Lamina densa weniger stark ausgeprägt ist. Die einzelnen Schichten der Membran sind in der Mausniere jedoch deutlicher abgrenzbar (11, 14).

Unterschiede in der Architektur der Tubuli finden sich ebenfalls. Das Epithel der Pars convoluta des proximalen Tubulus kann bei männlichen Mäusen Vakuolen aufweisen. In der Pars convoluta des distalen Tubulus ist der Bürstensaum weniger stark ausgeprägt als im proximalen Tubulus, in der humanen Niere fehlt er dort jedoch vollständig (14). In der Mausniere kommen im Vergleich zur humanen Niere deutlich mehr lange Henle-Schleifen mit einem aufsteigenden Anteil des Intermediärtubulus vor, was die Maus zu einer stärkeren Urinkonzentrierung befähigt und sich in der höheren Dichte

des Urins widerspiegelt. Dazu führt auch, dass in der Maus die dünnen absteigenden Äste der Henle-Schleifen von Bündeln der Vasa recta umhüllt sind, während sie in der humanen Niere voneinander getrennt vorliegen (14).

Trotz der Diskrepanz zur Anatomie einer humanen Niere, stellt die Untersuchung an Mäusenieren ein probates und akzeptiertes Modell zur Gewinnung von Erkenntnissen über die Nierenphysiologie und -pathophysiologie beim Menschen dar (15).

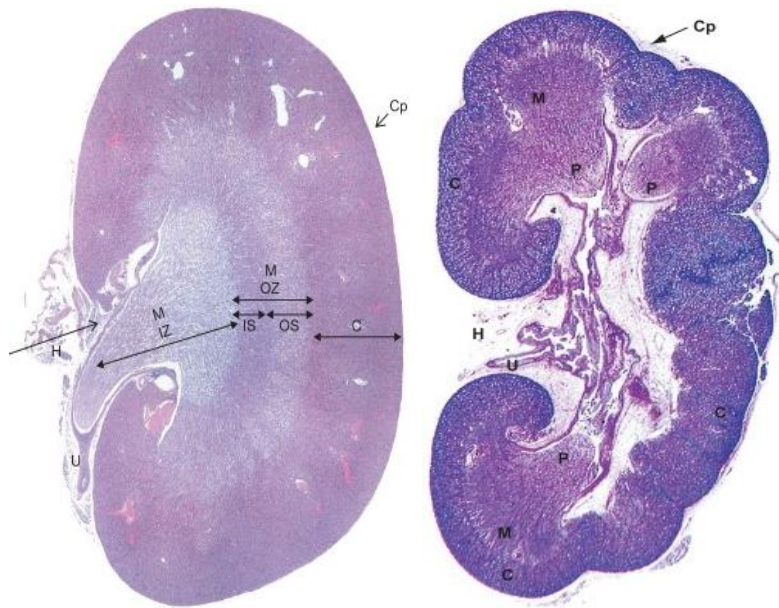


Abb. 3: Vergleich einer murinen und humanen Niere

Dargestellt ist links eine unipapilläre murine Niere und rechts eine multipapilläre humane Niere (P für Nierenpapillen). Die Unterschiede im histologischen Aufbau werden deutlich. Beide gliedern sich in einen Cortex (C), eine Medulla (M) und gehen am Hilus (H) in den Ureter (U) über. Umgeben sind sie von einer Kapsel (Cp). Bei der murinen Niere ist die Gliederung des Marks in eine Innenzone (IZ) und eine Außenzone (OZ) mit Innen- und Außenstreifen (IS und OS) gezeigt (14).

1.3 Untersuchungsmöglichkeiten am Nierengewebe

Wie in anderen Fachgebieten gelten in der renalen Forschung *in-vitro*-Zellkultursysteme als klassische Untersuchungsmöglichkeit. Zelllinien sind leicht verfügbar, können relativ einfach gehandhabt werden und sind in ihrer Kultivierung mit vergleichsweise geringen Kosten verbunden (16). Bei den untersuchten Zellen handelt es sich meist um segmentspezifische, immortalisierte Zelllinien, die v. a. aus dem proximalen Tubulus und Sammelrohr stammen (17). Es können Einblicke in die biologischen Prozesse in den Zellen gewonnen werden, jedoch eignet sich die Zellkultur ausschließlich für die Analyse eines ausgewählten Zelltyps, während die zelluläre Heterogenität und Komplexität des Nephrons nicht erfasst werden können (17). Zusätzlich wird die Kultivierung in einem künstlichen Wachstumsmilieu durchgeführt, wodurch das Verhalten der Zellen von äußeren Faktoren wie beispielsweise der Temperatur und dem

Nährmedium abhängt (16). Die Wachstumsbedingungen sind jedoch nur schlecht mit der komplexen physiologischen Zellumgebung im Organismus vergleichbar (18).

Angesichts der Limitationen der Zellkultursysteme sind andere Methoden erforderlich, wofür sich der klassische Tierversuch anbietet, bei dem spezifische Knockout-Mäuse zum Einsatz kommen. Die erhobenen Daten haben eine größere biologische Relevanz als Beobachtungen in der Zellkultur, jedoch sind Versuche mit Tieren kosten- und zeitaufwendig (19). Der vielfältige Einsatz von Tierversuchen wirft darüber hinaus auch ethische Fragen auf, da zunehmend mehr Tierschutz angestrebt wird (20).

Mit aufwändigen Methoden wie z. B. der Intravitalmikroskopie können dynamische Prozesse *in vivo* kontinuierlich beobachtet werden (21). Die renalen Strukturen lassen sich beispielsweise durch Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie visualisieren (22).

Um die Lücke zwischen der *in-vitro*-Zellkultur und einem *in-vivo*-Tierversuch zu schließen, existieren inzwischen mehrere Möglichkeiten, die strukturellen und funktionellen Charakteristika einer Niere außerhalb des Organismus zu erforschen (19). In solchen *ex-vivo*-Modellen kommt menschliches oder tierisches Gewebe zum Einsatz. Bei der MIPK (*mouse isolated perfused kidney*) -Technik handelt es sich um ein Modell, bei dem die Niere einer Maus *ex vivo* durch kontinuierliche Perfusion für mindestens eine Stunde lang funktionsfähig gehalten wird. Die Funktion des isolierten Organs lässt sich hierbei in einer kontrollierten Umgebung ohne systemische Einflüsse untersuchen und ermöglicht beispielsweise die Gabe von Medikamenten oder andere Manipulationen an der Niere unter dem Monitoring verschiedener renaler Funktionsparameter oder mit anschließender molekularer, biochemischer oder histologischer Analyse (15).

Die *ex-vivo*-Organkultivierung kommt ausschließlich in der Embryonalforschung zum Einsatz. Embryonale Nieren sind mehrere Tage lang in Nährmedien kultivierbar, da durch ihre Beschaffenheit und Größe die Vitalität durch einfache Diffusion aufrechterhalten werden kann. Ausgereifte, adulte Nieren hingegen sind sehr empfindlich gegenüber Hypoxie und werden über Diffusion nur mangelhaft mit lebenswichtigem Sauerstoff und Nährstoffen versorgt (23). Die Kultivierung unausgereifter, sich entwickelnder Nieren ist gleichwohl bedeutend, um die zellulären und molekularen Prozesse und Regulationsmechanismen während der Organogenese zu erforschen (24). Seit ihrem ersten beschriebenen Einsatz in den 1920er Jahren wurde die Nierenkulturtechnik

ständig weiterentwickelt (25). Das Grundprinzip besteht darin, eine embryonale Niere an der Grenzfläche zwischen einem Kulturmedium und der Gasphase (sog. Interphase) bei 37 °C und 5 % CO₂ zu inkubieren. Die Niere wird dabei oftmals auf einer Transwellfiltermembran und einem Sieb als Träger positioniert (26). Das Gewebe wurde früher routinemäßig 3 Tage lang kultiviert, inzwischen wurden die Kultivierungsbedingungen soweit optimiert, dass sich der mögliche Versuchszeitraum auf 7–10 Tage erhöht hat (26–29). Während der Kultivierung lässt sich die Niere zum Monitoring des Wachstums fotografieren (27). Außerdem sind verschiedene Modifikationen möglich wie z. B. die Zugabe biologisch aktiver Substanzen, etwa von Wachstumsfaktoren, Antikörpern oder Medikamenten (25). Anschließend an einen Versuch ist eine Analyse z. B. durch Färbung mit zellspezifischen Markern oder durch RNA- oder Proteinextraktion möglich (24). Auffällig ist, dass sich bei der Kultivierung junger embryonaler Nieren zwar typische renale Strukturen ausbilden, es jedoch zu keiner Bildung einer Medulla und von Henle-Schleifen kommt. Zur Untersuchung tubulärer Strukturen und ihrer Entwicklung ist die Nierenkultur damit nur beschränkt nutzbar (25).

Eine andere Möglichkeit der *ex-vivo*-Kultivierung ist die sog. „*precision-cut kidney slices*“-Kultur (PCKS). Mit dieser Technik kann auch adultes Nierengewebe in Kultur gehalten werden. Hierbei werden von Nieren mithilfe eines Stadie-Riggs-Gewebeschneider oder Vibratoms Schnitte mit einer Schnittdicke idealerweise unter 400–500 µm gefertigt, um eine durchdringende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und das Ausmaß an Nekrosen zu minimieren (18, 30). Die Schnitte werden in physiologischem Puffer oder einem Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und über einen Zeitraum von 48 bis max. 120 Stunden vital gehalten (18, 19, 31, 32). An den Schnitten lassen sich z. B. spezifische Transportfunktionen unter minimiertem Einfluss systemischer Faktoren wie des Blutflusses oder von Mediatoren untersuchen (32). Auch die Wirkung von Metaboliten, Medikamenten und Toxinen kann leichter als im *in-vivo*-Modell getestet werden (30). Dadurch, dass aus einem Organ mehrere Schnitte gefertigt werden, können mehrere Versuche gleichzeitig durchgeführt werden, wobei die Präparation jedoch in unphysiologischer Weise erfolgt (30, 33). Gleichzeitig reduziert sich im Vergleich zum klassischen Tierversuch die Anzahl benötigter Tiere (32). Neben Nieren kleinerer Säugetiere ist es möglich, auch humanes Gewebe zu kultivieren (18).

1.4 3D-*in-vivo*-Modell als alternative Untersuchungsmethode

1.4.1 Allgemeines

Eine Alternative zu klassischen Tierversuchen stellt das sog. Chorionallantoismembran-Modell (CAM-Modell) dar, das als 3D-*in-vivo*-Modell zahlreiche Untersuchungsmöglichkeiten für verschiedene Gewebeformen bietet (34). Im CAM-Modell können Zelllinien oder Gewebe direkt im Hühnerei für mehrere Tage kultiviert werden, was in den letzten Jahren v. a. in der Tumorforschung etabliert worden ist, um Aspekte der Tumorbilogie und -behandlung untersuchen zu können (35–37).

1.4.2 Entwicklung und Morphologie

Bei der Chorionallantoismembran handelt es sich um eine extraembryonale Membran, die unterhalb der Schalenhaut die äußerste Schicht um einen Hühnerembryo bildet. Sie entsteht ab dem 4. oder 5. Entwicklungstag aus dem Chorion und der Allantois (35). Die vollständig entwickelte CAM weist 3 Schichten auf, eine ektodermale, gebildet durch das Chorion, eine mesodermale, die durch Verschmelzung des somatischen Mesoderms des Chorions und des viszeralen Mesoderms der Allantois entsteht, und eine endodermale Schicht, die Allantois (38).

Nach der Fusion besteht das Chorion aus einem ein- bis mehrschichtigen flachen bis kubischen Epithel, dessen Zellen große nukleolenreiche Zellkerne besitzen. Bei der mesodermalen Schicht handelt es sich um ein zellarmes, weitmaschiges Stützgewebe, das sehr flüssigkeitsreich ist (39). Das ausgeprägte Gefäßsystem der Membran entwickelt sich in dieser Schicht und wird über die Allantoisgefäße versorgt (38). Die Kapillaren, die sich am 8. Entwicklungstag noch subepithelial befinden, sind am 10. Entwicklungstag teilweise zwischen die Chorionzellen vorgedrungen und nur durch eine dünne Schicht aus einschichtigen Zellen vom Stützgewebe getrennt (39, 40). An der Grenze zwischen den epithelialen Anteilen der Membran und dem Stützgewebe befindet sich beidseitig jeweils eine dünne Basalmembran. Bei der sich anschließenden Allantois handelt es sich um eine nach der Fusion ein- bis 3-schichtigen Epithelzellschicht, die im Laufe der Entwicklung mehrschichtiger werden kann und aus flachen bis kubischen Zellen mit großen Zellkernen besteht (39). In **Abb. 4** ist der Aufbau des CAM-Modells schematisch dargestellt.

1.4.3 Funktion der CAM

Die CAM ist für den Gas- und Stoffaustausch zwischen dem Hühnerembryo und der Umgebung zuständig, wofür sie über ein ausgeprägtes Kapillarnetz verfügt. Gase können durch die eng an das Chorion anliegende Eierschalenmembran und die Poren der Eierschale diffundieren (40). Zudem kann Calcium zur Mineralisierung der Knochen des Embryos aus der Eierschale mobilisiert werden, da ab dem 11. Entwicklungstag die vom Dottersack bereitgestellte Menge an Calcium den Bedarf des Embryos nicht mehr decken kann. Außerdem können in der CAM stickstoffhaltige Stoffwechselendprodukte wie Harnstoff, Ammonium und Harnsäure gelagert werden (38).

1.4.4 Anwendung als Untersuchungsmodell

Die gute Vaskularisation der CAM ermöglicht es, verschiedene Gewebeformen auf der Membran zu kultivieren (34). Die physiologische Umgebung des Gewebes wird durch die CAM und ihre extrazellulären Proteine imitiert, wobei die Gewebstransplantation dadurch erleichtert wird, dass die CAM in frühen Stadien immundefizient ist. Es wird angenommen, dass sich das Immunsystem des Hühnerembryos frühestens ab dem 14. Entwicklungstag ausbildet (35, 41).

Seit im Jahr 1911 die CAM erstmals als Möglichkeit genutzt wurde, um Zellen von Hühnersarkomen anzuzüchten, kam das Modell in immer mehr Bereichen zum Einsatz (34, 42). In der Tumorforschung bietet sich das CAM-Modell an, um die Tumorbilogie, aber auch das Wachstum, die Angiogenese, Invasivität und das Metastasierungsverhalten verschiedener Tumore zu untersuchen (34). In den letzten Jahren wurden für zahlreiche Tumoren Protokolle für ein 3D-*in-vivo*-Tumormodell entwickelt, so z. B. für das Osteosarkom und gynäkologische Tumoren (35, 43, 44). Einige der Anwendungsgebiete sind in **Abb. 4** dargestellt. Ein Vorteil des CAM-Modells besteht darin, dass menschliches Gewebe in Form von Tumorbiopsien kultiviert werden kann. Das CAM-Modell könnte als „patientenspezifisches 3D-Tumor-Therapie-Modell“ genutzt werden, indem am Tumorgewebe eines Patienten verschiedene Medikamente getestet werden, um die Erfolgsaussichten möglicher Behandlungsoptionen zu evaluieren und eine optimale patientenspezifische Therapie abzuleiten (43).

Darüber hinaus ist die Untersuchungsmethode im Vergleich zum konventionellen Tierversuch kostengünstiger, mit geringeren technischen Anforderungen verbunden und

damit relativ leicht zu handhaben. Eine große Anzahl an Versuchen ist parallel durchführbar und während des Versuchszeitraums ist eine *in-vivo*-Beobachtung möglich. Ein Versuch dauert lediglich eine Woche, so dass schnell Ergebnisse erlangt werden können (20). Ein weiterer Aspekt ergibt sich daraus, dass die CAM zum Versuchszeitpunkt nicht innerviert ist und sich das Nervensystem des Hühnerembryos erst schrittweise entwickelt (45). Durch das fehlende Schmerzempfinden während des größten Teils der Embryonalentwicklung unterliegt das CAM-Modell nicht dem Tierversuchsgesetz und ist ethisch besser vertretbar als klassische Tiermodelle (20). Als Leitziele moderner Forschung gelten laut einer Richtlinie der Europäischen Union die 3R-Prinzipien (*replace, reduce, refine*), die im Jahr 2013 im deutschen Tierschutzgesetz verankert worden sind und vom CAM-Modell erfüllt werden (46, 47): Tierversuche sollen durch andere Forschungsmethoden ersetzt (*replace*) und der Verbrauch an Versuchstieren soll auf ein Minimum reduziert werden (*reduce*). Zudem soll durch bessere Haltungsbedingungen die Belastung der Versuchstiere vermindert werden (*refine*) (48).

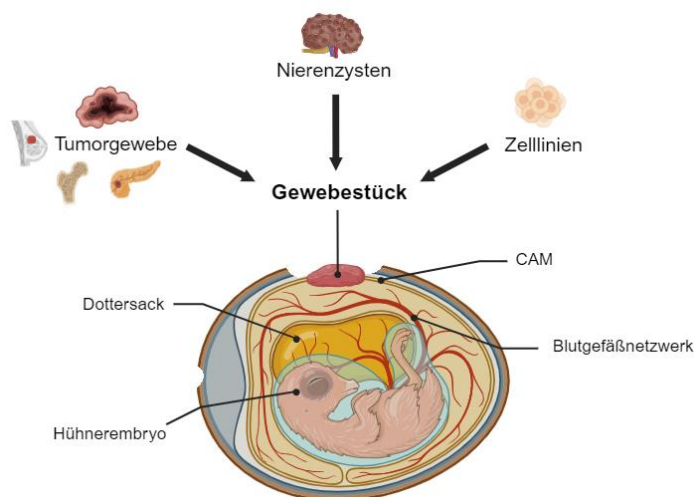


Abb. 4: Aufbau und Anwendung des CAM-Modells

Das Schema zeigt den Aufbau des CAM-Modells mit dem Hühnerembryo, seinem umgebenden Dottersack, das ausgeprägte Blutgefäßnetzwerk sowie die CAM, die eine Kultivierung von Gewebestücken ermöglicht. Dieses Gewebe kann beispielsweise aus menschlichen Tumoren, Nierenzysten oder Zelllinien stammen. Abbildung erstellt mit biorender.com.

1.4.5 Einsatz des 3D-*in-vivo*-Modells in der Nierenforschung

Das CAM-Modell bietet außerhalb der Tumorforschung Untersuchungsmöglichkeiten von Nierengewebe. Bereits vor etwa 90 Jahren wurden Experimente im CAM-Modell mit Nieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien verschiedener Spezies, wie z. B. Ratten und Hamstern durchgeführt (49–51). Auch das Verhalten und die Entwicklung embryonaler Nieren von Mäusen auf der CAM wurde untersucht (52, 53). Während Nieren in jungen Entwicklungsstadien typische renale Strukturen wie Glomeruli, sekretorische Tubuli und verzweigte Sammelrohre ausbildeten und wenige Nekrosen

aufwiesen, war die Kultivierung älterer embryonaler und v. a. ausdifferenzierter, adulter Nieren weniger erfolgreich, diese wurden überwiegend nekrotisch (49–51, 53). Teilweise wurde eine Invasion von Lymphozyten, Granulozyten und Bindegewebe in die untersuchte Niere beschrieben und mit der Entwicklung einer Artenspezifität ab einem bestimmten Alter des Spendergewebes und Huhns begründet (49, 54, 55). In anderen Experimenten wurde eine solche Wirtsreaktion jedoch nicht beobachtet (50, 51).

1.5 Fragestellung

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist es bisher nicht möglich, Nierenschnitte länger als einige Stunden in Kultur zu halten, da ausgewachsene Mäusenieren nicht durch reine Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schnitte von Nieren gesunder adulter Mäuse auf der CAM kultiviert, mit dem Ziel, die Nieren über einen längeren Zeitraum außerhalb des Organismus am Leben zu halten, um die Physiologie am lebenden gesunden Gewebe untersuchen zu können. Dabei kamen verschiedene Versuchsbedingungen zum Einsatz, um die Wachstumsbedingungen und damit den Erhalt der Vitalität der Nierenschnitte zu optimieren:

1. Es wurden unterschiedliche Abdeckungen getestet, die das Gewebe vor Austrocknung schützen und das Anwachsen auf der CAM begünstigen sollen.
2. Durch Zugabe verschiedener Medien und Wachstumsfaktoren sollte eine optimale Nährstoffversorgung der Nierenschnitte gewährleistet werden.
3. Die Versuchsdauer sollte so angepasst werden, dass eine Kultivierung der Nierenschnitte von maximaler Dauer bei minimal entstandenem Schaden möglich ist.

Die Analyse der Nierenschnitte erfolgte durch histologische Färbungen und teilweise durch transmissionselektronenmikroskopische Aufarbeitung.

Ziel war es, das CAM-Modell als 3D-*in-vivo*-Modell zur Bearbeitung nephrologischer Fragestellungen zu optimieren, um die Pathophysiologie an Schnitten akut oder chronisch krankhaft veränderter Nieren von Mäusen und bestimmte Entwicklungsprozesse an embryonalen Nieren untersuchen zu können. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten somit wesentliche Erkenntnisse für die Untersuchung an humanem, aus

Tumornephrektomien stammenden Material von Patienten mit einer chronischer Nierenerkrankung liefern.

In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurden bereits einige Mäusenierenschnitte auf der CAM kultiviert. Für die Immobilisation und ein erfolgreiches Anwachsen auf der CAM erschien eine Bedeckung der Schnitte mit einem Vlies notwendig, wobei sich Hinweise auf eine zumindest teilweise erhaltene Vitalität ergaben. Glomeruli, proximale Tubuli und Sammelrohre zeigten ein besseres Überleben als die hypoxieempfindlicheren Teile des Nephrons, Schäden zeigten v. a. der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife und der distale Tubulus (8). Vor einer Anwendung auf nephrologische Fragestellungen ist deshalb eine Verbesserung des Protokolls notwendig. Da sich unsere Arbeitsgruppe schwerpunktmäßig mit der Forschung zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) beschäftigt und im CAM-Modell bereits verschiedene potenzielle ADPKD-Therapeutika an humanen Nierenzysten von operierten ADPKD-Patienten getestet, sollen im Verlauf auch Schnitte von ADPKD-Mäusen auf der CAM kultiviert werden, um Erkenntnisse über die bisher noch unvollständig verstandenen pathophysiologischen Prozesse der Krankheit zu gewinnen. Einen Überblick über die Anwendung des CAM-Modells im Rahmen der Arbeit gibt **Abb. 5**.

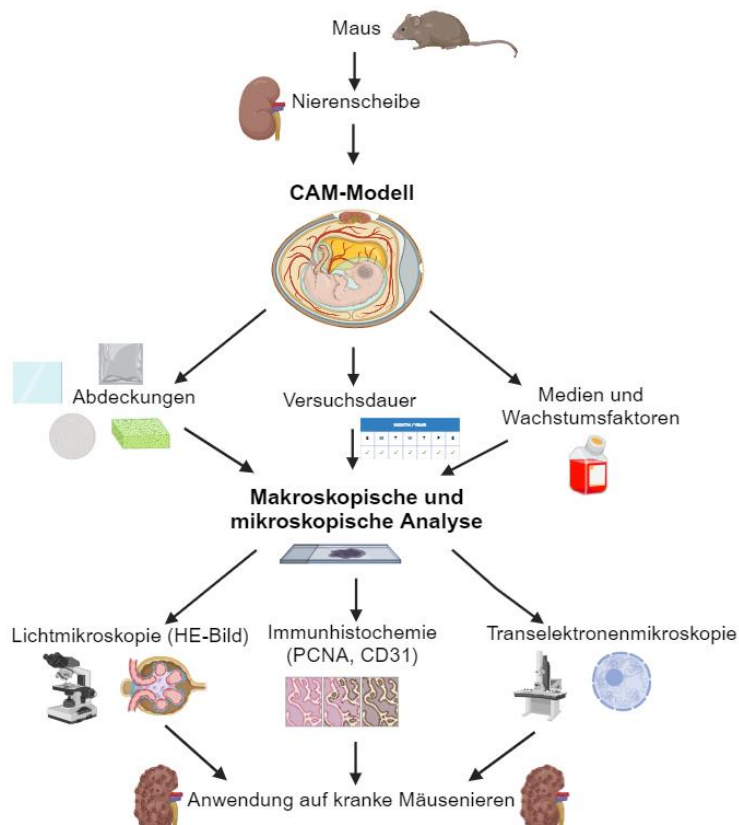


Abb. 5: Anwendung des CAM-Modells auf die Kultivierung von Mäusenieren:

Im Rahmen der Arbeit wurden Nierenscheiben von Mäusenieren auf der CAM kultiviert und verschiedene Versuchsbedingungen (Abdeckungen, Versuchsdauer, Wahl des Mediums) verglichen. Es erfolgte eine makroskopische sowie mikroskopische Analyse mittels Lichtmikroskopie, Immunhistochemie und Transelektronenmikroskopie. Übergeordnetes Ziel war die Anwendung auf kranke Mäusenieren. Abbildung erstellt mit biorender.com.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Neben dem üblichen Verbrauchsmaterial wie verschiedenen Reaktionsgefäßen und Instrumenten wurden folgende Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen, Geräte und Software-Programme verwendet.

2.1.1 Chemikalien, Medien und Antikörper

Name	Bezugsquelle
Agarose Standard	Roth, Karlsruhe
Kollagen I rat tail	Corning Life Sciences, Kaiserslautern
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose	Roth, Karlsruhe
Matrigel Matrix	Corning Life Sciences, Kaiserslautern
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Roth, Karlsruhe
Monoklonaler Anti-CD31-Antikörper (Ratte)	Dianova GmbH, Hamburg
Monoklonaler Anti-PCNA-Antikörper (Maus)	DAKO GmbH, Glostrup, Dänemark

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Medien mit Angabe der Bezugsquellen

2.1.2 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Agarosegel 1 %	0,24 g Agarose Standard 0,24 ml dH ₂ O in Mikrowelle 1 min erwärmt und für 24 h im Kühlschrank verfestigt.
Kollagengel (700 µl Gesamtvolumen)	70,0µl 10x PBS 12,3µl 1M NaOH 84,2µl dH ₂ O 533,5µl Kollagen I (3,28mg/ml) Zubereitung gemäß Analysenzertifikat

DMEM High Glucose mit Zusätzen	100 ml DMEM 450 mg/dl High Glucose 1,010 ml 2 mM L-Glutamin 1,010 ml 10 mM HEPES 5 µg/ml Insulin 5 µg/ml Transferrin 5 ng/ml Natriumselenit 25 ng/ml Prostaglandin E 32 pg/ml T3
Paraformaldehyd (4% PFA in 1x PBS, pH 7,4)	8 g Paraformaldehyd 100 ml dH ₂ O 4 Tropfen NaOH 20 ml 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 4 Tropfen HCl 200 ml dH ₂ O
PBS-Puffer 10x (pH 7,4)	22,8 g 10 mM K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 81,8 g 140 mM NaCl 1,4 g 10 mM KH ₂ PO ₄ 1000 ml dH ₂ O
PBS-Puffer 1x (pH 7,4)	100 ml 10x PBS 900 ml dH ₂ O

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen mit Angabe der Zusammensetzung

2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Aclar Fluoropolymer-Film (Aclarfolie, 200 µm)	Science Services, München
Baumwollgaze	OLKO, Kaufland
Cellophan Bodenbeutel	PureNature, Idar-Oberstein
Deckgläschen (rund, 15 mm Durchmesser)	Langenbrinck, Emmendingen
Einbettautomaten (Paraffinausgießstation) HistoCore Arcadia	Leica Biosystems, Wetzlar

Frischhaltefolie	Aromata, Neckarsulm
Gartenvlies	HaGa-Welt GmbH, Elze
Gewebeinfiltrationsautomaten	Leica Biosystems, Wetzlar
Inkubator	ProCon automatic systems GmbH & Co. KG, Mücke/Sellnrod
Leica M205 A	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Schwamm/Topfreiniger	Essentials by Spontex, Zeven
Silikonkautschukschlauch	Sourcingmap, Kwai Fong
Windradfolie (200 µm)	Ideen mit Herz, Bielefeld

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Bezugsquellen

2.1.4 Software

Name	Referenz
CaseViewer und SlideViewer	3DHistech, Budapest, Ungarn
GraphPad Prism 9.2.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institut of Health, Bethesda, MD, USA
Leica Application Suite 4.13.0	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, WA, USA
Precipoint Viewpoint	PreciPoint GmbH, Freising

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Software-Programme mit Angabe einer zugehörigen Referenz

2.1.5 Versuchstiere

Die für die Versuche eingesetzten Nieren stammten von C57/Bl6-Mäusen der Mauslinien TRPV4/Pkd2-flox und Lmx1b und sind bei Experimenten am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg angefallen. Das Alter der Mäuse lag zwischen 141 und 316 Tagen. Insgesamt wurden 33 Mäuse eingesetzt, davon waren 31 männlich und 2 weiblich.

2.2 Experimente im CAM-Modell

Die Durchführung der Experimente im CAM-Modell erfolgte in Anlehnung an die bereits am Institut etablierte Methode (8).

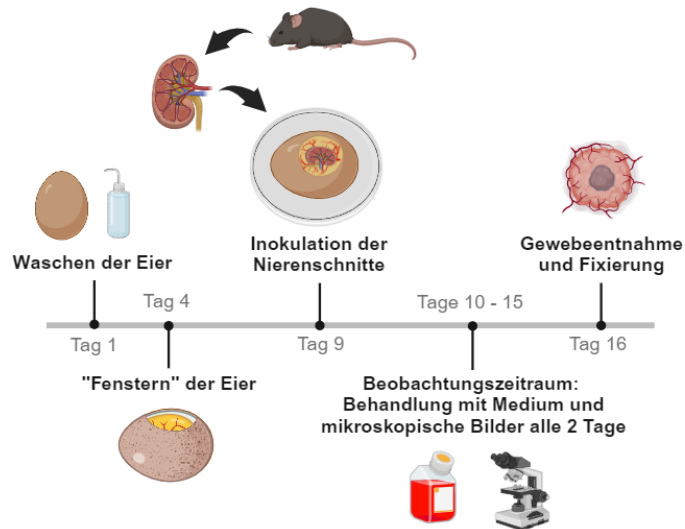


Abb. 6: Ablauf eines Experiments im CAM-Modell (erstellt mit biorender.com)

2.2.1 Vorbereitung der Eier

Es wurden bebrütete Hühnereier verwendet, die von einem lokalen Biohof stammten. Diese wurden zunächst mit Leitungswasser gewaschen und mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert, um mögliche Kontaminationsquellen wie Schmutz, Federn und Keime von der Eierschale zu entfernen. Daraufhin wurden die Eier mit dem aktuellen Datum und dem sog. Ei-Eingangdatum beschriftet, die der Dokumentation dient.

Die Hühnereier wurden in einem Brutschrank bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 % und einer Temperatur von 37 °C bei atmosphärischem Druck inkubiert und durch das Auflegen in longitudinaler Position auf beweglichen Rollen gleichmäßig rotiert, um die natürliche Bebrütung durch die Henne zu imitieren.

Nach viertägiger Inkubation wurden die Eier geöffnet und ein „Fenster“ in die Eierschale eingebracht, um im Verlauf Gewebe im Ei kultivieren zu können. Dazu wurde mithilfe einer Lichtquelle im Inneren des Eis die Luftblase, die als helle kreisförmige Fläche erschien, aufgesucht und markiert. An der gekennzeichneten Stelle wurde die Eierschale zur Stabilisierung mit einem Pflasterstreifen abgeklebt und durch eine Schere ein erstes Loch mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm in die Schale geschnitten. Der dabei entstandene Niederdruck sorgte für ein Ablösen der

Chorionallantoismembran von der Eierschale und ein Absinken des Embryos und der Membran und ermöglichte, an der Längsseite des Hühnereis ein ähnlich großes zweites Fenster zu schneiden, ohne die Strukturen im Hühnerei zu verletzen. Beide Fenster wurden mit einem Pflasterstreifen verschlossen, um den Embryo vor Austrocknung und Kontamination zu schützen.

Während des „Fensters“ konnten außerdem der Befruchtungsstatus und die Vitalität der Embryonen überprüft werden: Unbefruchtete Eier weisen keine erkennbaren Blutgefäße auf und erscheinen homogen gelb, während in befruchteten Eiern ein zartes Kapillarnetz und der Herzschlag des Embryos erkennbar sind. Die gefensternten, befruchteten Hühnereier wurden mit einer Einnummer versehen, in Glasschalen mit autoklaviertem Sand aufbewahrt und für weitere 5 Tage ohne Rotation inkubiert.

Am Tag vor der Inokulation wurde das Fenster auf der Längsseite des Eis auf einen Durchmesser von ca. 1,5 cm vergrößert.

2.2.2 Inokulation der Nierenschnitte

Die Inokulation der Nierenschnitte erfolgte standardisiert am 9. Entwicklungstag. Die Tötung der eingesetzten Versuchsmäuse durch Genickbruch und Präparation der Nieren erfolgte durch eine technische Assistentin mit entsprechender Berechtigung. Die Nieren wurden unmittelbar nach der Entnahme in einer Petrischale mit dem späteren Behandlungsmedium (in der Regel RPMI) gehalten und zügig weiterverarbeitet, um eine bestmögliche Versorgung mit Nährstoffen trotz unterbrochener Blutversorgung zu ermöglichen und die Zeit bis zur Inokulation so kurz wie möglich zu halten (**Abb. 7a**).

Die Kapsel der Niere wurde mit einer Pinzette vollständig entfernt, bevor mit zwei Rasierklingen die Nierenpole abgetrennt und vom restlichen Nierengewebe etwa 600-800 µm dicke Querschnitte gefertigt wurden (**Abb. 7b**). Jeweils ein Schnitt pro Niere wurde für eine anschließende histologische Analyse direkt in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7,4 fixiert.

Die Inokulation des Nierenschnitts erfolgte an einer zentralen Stelle der CAM mit gut entwickelten Blutgefäßen, um das Anwachsen und die Behandlung des Gewebes zu erleichtern. Die CAM wurde an der entsprechenden Position mit einer Pipettenspitze leicht angeraut, um eine Mikroblutung zu induzieren, die für ein besseres Anwachsen

des Gewebes sorgen sollte. Mit einer Pinzette wurde der Nierenschnitt auf die gewählte Stelle aufgetragen und für ein besseres Anhaften hin- und herbewegt.

Im Anschluss erfolgte eine topische Behandlung mit 100 µl Medium (in der Regel RPMI) mit einer Pipette, bevor die jeweilige Abdeckung auf den Nierenschnitt gelegt wurde. Zur Dokumentation wurden mikroskopische Bilder erstellt (**Abb. 7c**).

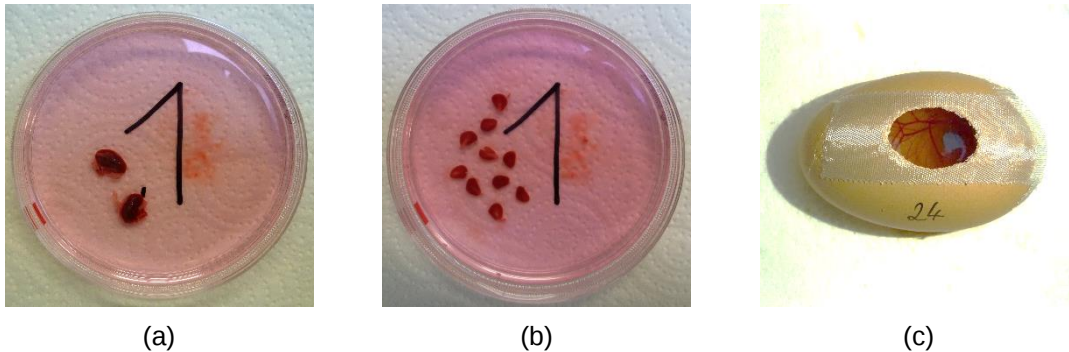


Abb. 7: Arbeitsschnitte vor Inokulation des Gewebes

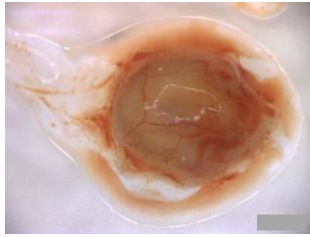
(a) Nieren nach Entnahme aus der Maus im Medium, (b) Nierenquerschnitte im Medium, (c) Blick auf die CAM vor Inokulation eines Nierenschnitts

2.2.3 Beobachtungszeitraum

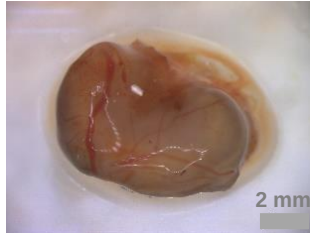
Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde das Gewebe auf der Membran kultiviert. Alle 24 Stunden erfolgte zur Nährstoffversorgung der Nieren eine topische Behandlung mit 100 µl Medium, das zuvor im Wasserbad erwärmt worden war. Je nach Versuchsansatz wurde die Abdeckung täglich zur Behandlung gewechselt oder auf der Niere belassen. Zudem wurde die makroskopische Entwicklung der Nierenschnitte und Blutgefäße auf der CAM beobachtet. Zur Beurteilung und Dokumentation des Versuchsverlaufs wurden alle 2 Tage mikroskopische Bilder angefertigt.

2.2.4 Versuchsende

Nachdem mikroskopische Bilder erstellt worden waren, wurden die Nierenschnitte von der CAM explantiert und für weiterführende histologische Untersuchung vorbereitet. Die Entnahme erfolgte mithilfe einer mikrochirurgischen Schere und Pinzette, wobei neben der Niere auch ein Teil der umgebenden CAM präpariert wurde (**Abb. 8**). Die Embryonen wurden unmittelbar nach der Präparation getötet, indem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Gewebestücke wurden in 4 % PFA in PBS, pH 7,4 fixiert und bis zur Weiterverarbeitung für die histologische Analyse gekühlt aufbewahrt.



(a)



(b)

Abb. 8: Nierenschnitte nach Exokulation in der Ansicht von unten

(a) Längsschnitt mit Kapsel und Ring
(b) ohne Abdeckung; Maßstab 2 mm

2.3 Versuchsreihen

Insgesamt wurden in mehreren Versuchsreihen 282 Nierenschnitte inokuliert. Das Grundprinzip der Versuchsdurchführung war in allen Versuchen gleich, es wurde RPMI als Behandlungsmedium eingesetzt und eine Versuchsdauer von 7 Tagen festgesetzt. Jedoch unterschieden sich die Versuchsreihen in der Wahl der Abdeckungen (**s. Abb. 9**). Teilweise wurden auf der Suche nach den optimalen Versuchsbedingungen unterschiedliche Behandlungsmedien (DMEM High Glucose, DMEM Low Glucose und ein DMEM-Kulturmedium mit Zusatzstoffen) eingesetzt. In 2 Versuchen wurden täglich einige Nieren von der CAM entnommen, um verschiedene Versuchsdauern zu testen. Die benötigten Abdeckungen wurden vor Versuchsbeginn autoklaviert und zum Versuchsende gemeinsam mit der Niere und umliegenden CAM mit einer Pinzette präpariert. Eine besondere Vorbereitung erforderte die Handhabung mit Matrigel und Kollagen. Das Matrigel, eine basalmembranartige Matrix in Gelform, die als komplexe Mischung von Biomolekülen wie u. a. Laminin, Entactin und Kollagen als Wachstumsgrundlage für Tumorzellen und Gewebe verwendet wird, wurde langsam auf Eis aufgetaut, mit einem Nierenschnitt vermischt und vor der Inokulation für 10 min im Brutschrank zum Aushärten inkubiert. Das Kollagengel wurde gemäß dem Protokoll im Analysenzertifikat zubereitet. Hierbei war darauf zu achten, dass die benötigten Substanzen auf Eis gehalten wurden, das Kollagen zuletzt zugegeben wurde und sich beim Vermischen keine Blasen bildeten. Die Niere wurde auf die CAM gelegt und die Kollagenlösung gleichmäßig auf und um die Niere pipettiert und zur Polymerisierung 30 min im Brutschrank inkubiert, bevor die Schnitte wie gewohnt behandelt wurden. Nachfolgend sind die versuchsspezifischen Bedingungen dargestellt (**Tabelle 5**).

Ohne Abdeckung	Längsschnitt Mit Kapsel
Vlies	Frischhaltefolie
Deckgläschen	Schwamm
Aclarfolie	Cellophan (mit täglichem Wechsel)
Folie	Cellophan (ohne täglichen Wechsel)
Agarosescheibe 1 %	Ohne Abdeckung mit Ring
Agarosering 1 %	Frischhaltefolie mit Ring
Gartenvlies	Matrigel mit Ring
Baumwollgaze	Längsschnitt mit Kapsel und Ring
Filterpapier	Cellophan mit Ring (mit täglichem Wechsel)
Matrigel 9,3 Mg/MI	Kollagen mit Ring
Eppendorfdeckel	

Tabelle 5: Überblick über die eingesetzten Abdeckungen

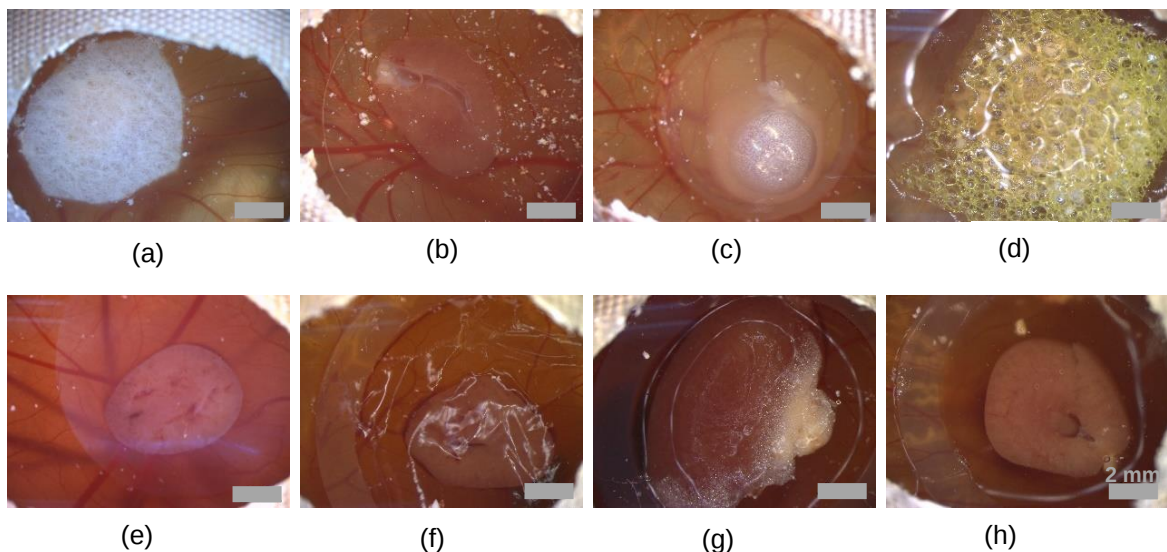


Abb. 9: Nierenschnitte unter verschiedenen Abdeckungen

(a) mit Vlies, (b) mit Aclarfolie, (c) mit Agarosescheibe, (d) mit Schwamm, (e) mit Cellophan, (f) mit Frischhaltefolie und Ring, (g) Längsschnitt mit Kapsel und Ring, (h) mit Kollagen und Ring; Maßstab 2mm.

2.4 Histologische Verarbeitung

2.4.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach 6-tägiger Fixierung wurde das PFA durch 3 Waschschrirte mit PBS unter Schütteln für jeweils 30 min bei 4 °C von den Gewebestücken entfernt. Vor einer Einbettung in hydrophobes Paraffin mussten die Präparate erst entwässert werden, wofür sie in Einbettkassetten positioniert wurden und in einem Gewebeinfiltrationsautomaten für 26 Stunden eine aufsteigende Alkoholreihe durchliefen: Die Entwässerung folgte einem standardisierten Programm, das jeweils 1,5 Stunden in 50 % Isopropanol, 70 % Isopropanol, 80 % Isopropanol, 96 % Isopropanol, dreimal 100 % Isopropanol, zweimal Xylol und anschließend dreimal Paraffin für 4 Stunden umfasste.

Mithilfe eines Einbettautomaten wurden die entwässerten Gewebestücke anschließend in Paraffin eingebettet. Hierfür wurden die Präparate in Einbettförmchen mit flüssigem, 60 °C warmen Paraffin gelegt, in der richtigen Ausrichtung positioniert, mit Paraffin bedeckt und auf einer gekühlten Platte abgekühlt und ausgehärtet. Die Paraffinblöcke konnten daraufhin im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Die histologischen Schnitte der Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom gefertigt. Dazu wurde das Präparat eingespannt und zunächst mit einer Schnittdicke von 14 µm im „Trim-Modus“ geschnitten, bis die Niere mittig angeschnitten und damit die gewünschte Stelle im Präparat erreicht war. Daraufhin wurde auf den „Select-Modus“ umgestellt und Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm gefertigt, die in einem 37 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger übertragen wurden. Dieser wurde zur vollständigen Trocknung erst auf eine Heizplatte gelegt und dann über Nacht in einem Trockenschrank bei 37 °C inkubiert.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Alle Präparate wurden zur morphologischen Beurteilung routinemäßig mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt. Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine weit verbreitete Standardfärbung, mit der wichtige gewebspezifische Strukturen angefärbt und durch unterschiedliche Affinität der Farbstoffe zu bestimmten Gewebsbestandteilen differenziert werden können.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der aus dem Blauholzbaum stammt und durch seine basischen, kationischen Eigenschaften saure Strukturen in einer Zelle bindet und blau färbt, also zum Beispiel die RNA der Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum und DNA in den Zellkernen. Das synthetisch hergestellte Eosin hingegen bindet als saurer, anionischer Farbstoff basische Komponenten wie cytoplasmatische Proteine, Mitochondrien und Sekretgranula und färbt diese rot. Dementsprechend erscheinen in der HE-Färbung Zellkerne blau, Cytoplasma und Kollagen rot und elastische Fasern blassrot oder ungefärbt (11).

Vor der HE-Färbung, einer Färbung auf Wasserbasis, mussten die hydrophoben Präparate zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden die Objektträger zweimal für 10 min in Xylol getaucht, um anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe geführt zu werden: Die Schnitte blieben zweimal für 2 min in 100 % Isopropanol und dann für jeweils 2 min in 96 % Isopropanol, 80 % Isopropanol, 70 % Isopropanol und 50 % Isopropanol, bevor sie in Aqua dest. gespült wurden.

Für die Zellkernfärbung wurden die Präparate unter ständigem Auf- und Abbewegen der Objektträger für 2 min mit filtriertem Hämatoxylin inkubiert und danach kurz in Aqua dest. gewaschen. Um überschüssige Farbpartikel zu entfernen, wurden die Schnitte kurz in 0,1 % HCl-Alkohol getaucht, bevor sie für 10 min unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser differenziert wurden. Im nächsten Schritt wurde für 1 min mit filtriertem 0,1 % Eosin G das Cytoplasma angefärbt.

Nach Abwaschen der Färbelösung mit Aqua dest. wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt: Die Schnitte wurden für jeweils 3 s in 70 % Isopropanol, 80 % Isopropanol, 96 % Isopropanol und zweimal 100 % Isopropanol getaucht und daraufhin zweimal für 10 min in Xylol gelegt. Anschließend wurden die gefärbten Objekte mithilfe des Eindeckmediums DePeX und Deckgläschen fixiert und für 3 Tage bei Lufttemperatur ausgehärtet.

2.4.3 Weitere Färbungen und Analysen

Eine spezifische und detaillierte Analyse ausgewählter Präparate erfolgte mithilfe verschiedener immunhistochemischer Färbungen, die am Institut der Universität Erlangen durchgeführt wurden. Zum einen wurden proliferierende Zellen in der Niere und CAM

durch einen monoklonalen Mausantikörper, der gegen das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) gerichtet ist, nachgewiesen. Zum anderen erfolgte ein Nachweis CD31 exprimierender Endothelzellen in der Niere und CAM sowie CD31 positiver Hühnererythrozyten durch einen monoklonalen Ratten-Antikörper.

Zudem wurden einige Präparate zur Beurteilung der Ultrastruktur im Transmissionselektronenmikroskop nach Exokulation in 0,1 M Cacodylatpuffer mit 2 % Glutaraldehyd fixiert. Die weitere Probenverarbeitung wurde von der Technischen Assistentin der Arbeitsgruppe durchgeführt. Nach der Blockkontrastierung mit 1 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer und anschließend mit 1 % Uranylacetat in Wasser wurden die Proben schrittweise dehydratisiert und in Epoxiharz (Epon) eingebettet. Mit dem Ultramikrotom wurden 70 nm Ultradünnschnitte angefertigt und auf Pioloform-beschichtete Slot Grids gezogen. Im Anschluss wurden am Transmissionselektronenmikroskop Bilder aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Veröffentlichung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit habe ich zur Publikation „A 3D In Vivo Model for Studying Human Renal Cystic Tissue and Mouse Kidney Slices“, Bichlmayer et al., die in der Zeitschrift Cells 2022 publiziert wurde, beigetragen (8). Mein Schwerpunkt lag dabei insbesondere auf der Ausarbeitung der Methodik und der Beschreibung der experimentellen Ansätze.

3.2 Auswertung

3.2.1 Makroskopische Auswertung

Zur makroskopischen Beurteilung der Versuchsbedingungen wurden 6 relevante Kriterien gewählt, die von einer optimalen Abdeckung erfüllt werden sollten:

Zum einen sollte die Abdeckung den Nierenschnitt über den gesamten Versuchszeitraum hinweg immobilisieren, also an der Stelle der Inokulation halten, um eine rasche Integration in die CAM zu ermöglichen. Zum anderen sollte der Nierenschnitt während des gesamten Behandlungszeitraumes gut behandelbar sein und kontinuierlich feucht bleiben, um eine konstante, durchdringende Nährstoffversorgung durch das Medium zu ermöglichen. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, die Entwicklung des Gewebes aufgrund der Transparenz der Abdeckung beobachten zu können. Die Abdeckung sollte den Stoffaustausch des Embryos nicht stören und zu keiner mechanischen Reizung der CAM führen, so dass die Überlebensfähigkeit der Eier und die Lösbarkeit der Abdeckung vom Nierenschnitt weitere wichtige Kriterien darstellen.

Die Beurteilungskriterien werden für jeden Nierenschnitt nach einem 3-stufigen Punktesystem bewertet, wobei 0, 1 oder 2 Punkte vergeben werden. Maximal können 12 Punkte erreicht werden. Die Ergebnisse werden den Ergebnissen der histologischen Auswertung gegenübergestellt und in den Gesamtzusammenhang eingeordnet.

3.2.2 Mikroskopische Auswertung

Neben einer groben makroskopischen Beurteilung des Erscheinungsbildes der Niere während und nach der einwöchigen Kultivierung auf der CAM lag der Fokus der Auswertung auf der Histologie der Nierenpräparate. Die Auswertung der histologischen Präparate wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Christoph Daniel (Institut für Nephropathologie des Universitätsklinikums Erlangen) und Herrn PD Dr. Björn Buchholz (Medizinische Klinik für Nephrologie und Hypertensiologie des Universitätsklinikums Erlangen) durchgeführt.

Eine grobe morphologisch-histologische Beurteilung des generellen Schädigungsausmaßes der Nierenschnitte erfolgte anhand der HE-Färbung, eine genauere Untersuchung immunhistochemisch mittels PCNA-Markierung zur Detektion proliferierender Zellen und CD31-Markierung zur Analyse der Blutgefäßentwicklung. Ergänzend wurde an ausgewählten Präparaten eine transmissionselektronenmikroskopische Beurteilung durchgeführt.

Zur Beurteilung des Schädigungsausmaßes wurde jeder HE-gefärbte Nierenschnitt nach definierten histomorphologischen Kriterien in Anlehnung an andere histologische Auswertungsprotokolle semiquantitativ ausgewertet (56, 57). Die Bewertung erfolgte verblindet, d. h. ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit, wobei die Reliabilität der Ergebnisse im Anschluss stichprobenartig durch Wiederholung der Bewertung einzelner Präparate kontrolliert wurde. Alle Auswertungen wurden an den eingescannten HE-Präparaten bei 40facher Vergrößerung im SlideViewer vorgenommen.

Das Schädigungsausmaß wurde anhand von 4 Parametern erfasst und jeweils in einem 5-stufigen Scoringssystem von 0 (gut) bis 4 Punkten (schlecht) semiquantitativ graduiert: Neben der glomerulären und tubulointerstitiellen Schädigung wurden der CAM-Übergang und die oberflächliche Region mit verschiedenen Kriterien beurteilt.

Glomeruläre Schädigung:

Zur Einschätzung der glomerulären Schädigung wurden 10 Glomeruli in der peripheren Region des Präparats zufällig ausgewählt und anhand folgenden Scoringssystems beurteilt:

Stadium	Histologische Veränderung (glomeruläre Schädigung)
0	> 60 Zellkerne / glomerulären Anschnitt < 3 % abnormale Zellkerne kaum Füllung oder Erweiterung des Kapselraums
1	50–60 Zellkerne / glomerulären Anschnitt < 10 % abnormale Zellkerne geringe Füllung oder Erweiterung des Kapselraums
2	40–50 Zellkerne / glomerulären Anschnitt 10–20 % abnormale Zellkerne reichliche Füllung oder Erweiterung des Kapselraums
3	20–40 Zellkerne / glomerulären Anschnitt 20–30 % abnormale Zellkerne ausgeprägte Füllung oder Erweiterung des Kapselraums
4	< 20 Zellkerne / glomerulären Anschnitt > 30 % abnormale Zellkerne massenhafte Füllung oder Erweiterung des Kapselraums

Tabelle 6: Glomerulärer Schädigungsscore

Tubulointerstitielle Schädigung:

Das Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigung wurde in 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern in der peripheren Region des Präparats folgendermaßen bewertet:

Stadium	Histologische Veränderung (tubulointerstitielle Schädigung)
0	keine abnormalen oder fehlenden Zellkerne kein interstitieller Zelldetritus (sich auflösende bzw. abgelöste Zellen) kaum Füllung oder Erweiterung des Tubuluslumen keine Tubulusatrophie (Abflachung des Tubulusepithels, Abgrenzbarkeit der Zell-Lumen-Grenze)
1	< 10% abnormale oder fehlende Zellkerne < 10% interstitielle Zellen geringe Füllung oder Erweiterung des Tubuluslumen < 10 % Tubulusatrophie
2	10–25 % abnormale oder fehlende Zellkerne 10–20 % interstitielle Zellen

	reichliche Füllung oder Erweiterung des Tubuluslumen 10–25 % Tubulusatrophie
3	25–50 % abnormale oder fehlende Zellkerne 20–30 % interstitielle Zellen ausgeprägte Füllung oder Erweiterung des Tubuluslumen 25–50 % Tubulusatrophie
4	> 50 % abnormale oder fehlende Zellkerne > 30 % interstitielle Zellen massenhafte Füllung oder Erweiterung des Tubuluslumen > 50 % Tubulusatrophie

Tabelle 7: Tubulointerstitieller Schädigungsscore

CAM-Übergang:

Das Ausmaß der Schädigung an der Übergangszone zwischen CAM und Nierengewebe wurde anhand der prozentualen Ausdehnung der charakteristischen zellkernfreien Zone und der Menge an interstitiellen Zellkernen nach folgendem Schema beurteilt:

Stadium	Histologie des CAM-Übergangs
0	Nierengewebe am CAM-Übergang nicht geschädigt keine interstitiellen Zellkerne
1	< 10 % des Nierengewebes am CAM-Übergang geschädigt < 10 % interstitielle Zellkerne
2	10–25 % des Nierengewebes am CAM-Übergang geschädigt 10–25 % interstitielle Zellkerne
3	25–50 % des Nierengewebes am CAM-Übergang geschädigt 25–50 % interstitielle Zellkerne
4	> 50 % des Nierengewebes am CAM-Übergang geschädigt > 50 % interstitielle Zellkerne

Tabelle 8: Schädigungsscore für den CAM-Übergang

Oberfläche:

Die prozentuale Ausdehnung der geschädigten oberflächlichen Zone und Zustand der Oberfläche spiegeln sich in einem weiteren Scoringsystem wider:

Stadium	Histologie der Oberfläche
0	< 3 % des oberflächlichen Nierengewebes geschädigt Oberfläche intakt
1	< 10 % des oberflächlichen Nierengewebes geschädigt Oberfläche leicht geschädigt
2	10–20 % des oberflächlichen Nierengewebes geschädigt Oberfläche leicht geschädigt
3	20–30 % des oberflächlichen Nierengewebes geschädigt Oberfläche stark geschädigt
4	> 30 % des oberflächlichen Nierengewebes geschädigt Oberfläche global stark geschädigt

Tabelle 9: Schädigungsscore für die Oberfläche

Bei der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferationsmarker PCNA wurden pro Schnitt die positiven Zellkerne glomerulärer und tubulointerstitieller Zellen erfasst. Das Vorkommen von CD31-positiven Zellen als Nachweis von Hühnererythrozyten wurde lokalisiert. An den elektronenmikroskopischen Präparaten wurde der Zustand der renalen Strukturen anhand des Erhalts von Zellkernen, Zytosol, Basalmembranen und Podozyten mit ihren Fußfortsätzen beurteilt.

3.2.3 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Das statistische Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert und durch eine einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey-Post-hoc-Test zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte aller Gruppen ermittelt. Als Software zur statistischen Analyse und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet.

3.3 Makroskopische Beurteilung der Versuchsbedingungen

Makroskopisch konnte beobachtet werden, dass die Nieren von Tag zu Tag zunehmend kleiner und kugelig wurden, sich gelb bis bräunlich verfärbten und v. a. oberflächlich stark vertrockneten. Die auf die Niere zulaufenden Blutgefäße auf der CAM nahmen kontinuierlich an Dicke und Verzweigungen zu (**Abb. 10**).

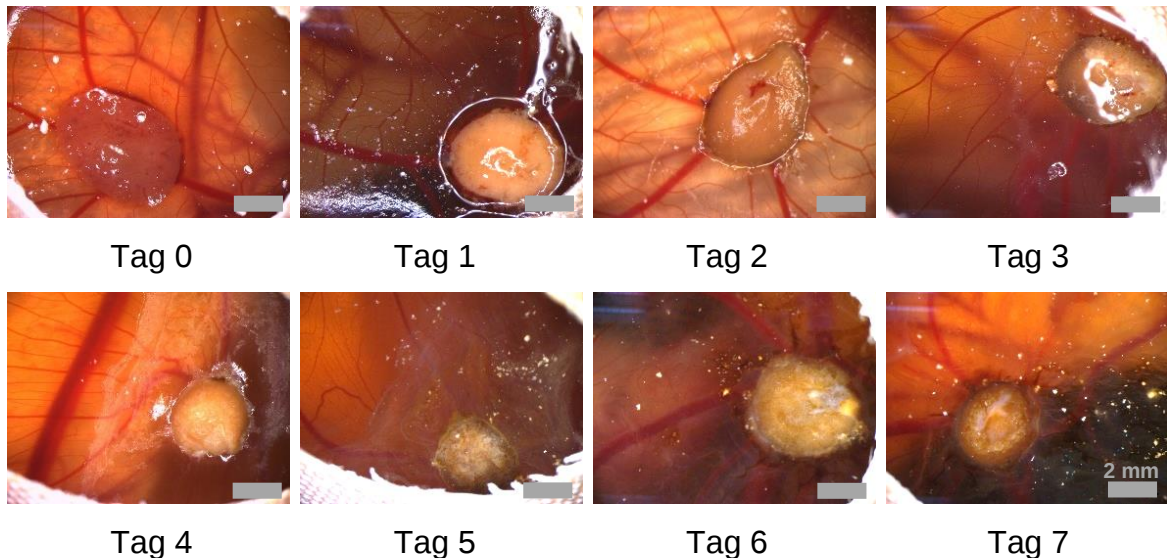


Abb. 10: Bilder von exemplarischen Nierenschnitten

Die makroskopischen Veränderungen der Nierenschnitte über den Versuchszeitraum zwischen Tag 0 (nach der Inokulation) und Tag 7 (vor der Exokulation) sind deutlich zu sehen. Maßstab 2 mm.

Die eingesetzten Abdeckungen wurden makroskopisch hinsichtlich der 6 relevanten Kriterien (Immobilisation, Behandelbarkeit, Feuchte, Transparenz, Überlebensfähigkeit, Lösbarkeit), die eine optimale Abdeckung erfüllen sollte, beurteilt und miteinander verglichen (**Abb. 11**).

Insgesamt schnitt Cellophan, das täglich gewechselt wurde, mit einem Gesamtscore von 11 Punkten am besten ab, wobei es 1 Punkt Abzug für die verglichen mit anderen Abdeckungen geringe Überlebensrate der Eier gab (**Abb. 12**).

Dahinter erfüllten der Längsschnitt mit der Kapsel als natürlichen Schutz (**Abb. 12**), die Kultivierung ohne Abdeckung sowie mit Schwamm und Cellophan ohne einen Wechsel der Folie einen Score von 9 Punkten. Bei den Schnitten ohne Abdeckung fiel dabei v. a. die starke Austrocknung auf, mit Schwamm war die fehlende Transparenz entscheidend. Verglichen zum täglichen Wechsel führte eine Behandlung ohne Wechsel des Cellophans zu einer reduzierten Feuchte und in der Folge zu einer schlechteren Lösbarkeit der Folie, so dass das Gewebe teilweise zerfiel.

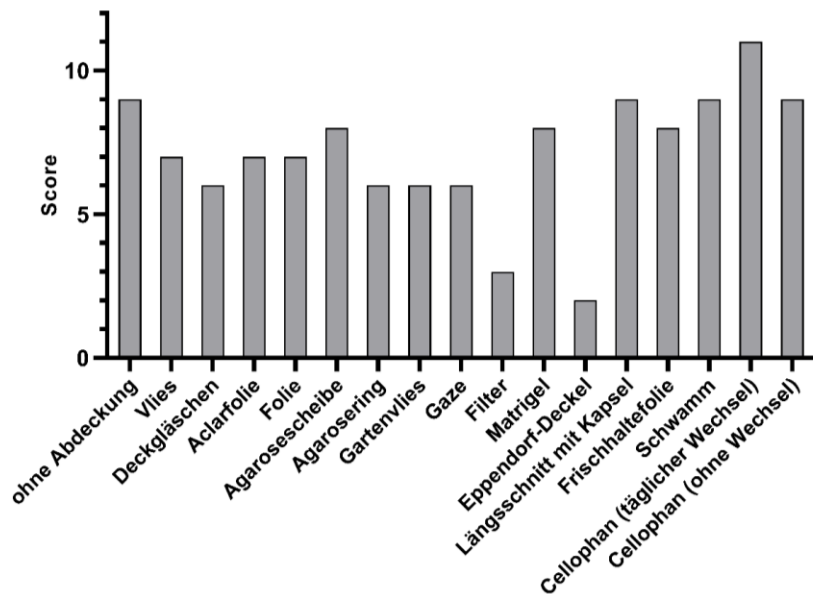


Abb. 11: Vergleich der Nierenschnitte anhand des makroskopischen Beurteilungsscores

Die Nierenschnitte unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden anhand definierter makroskopischer Kriterien bewertet, wobei eine maximale Punktzahl von 12 Punkten zu erreichen war (n = 54).

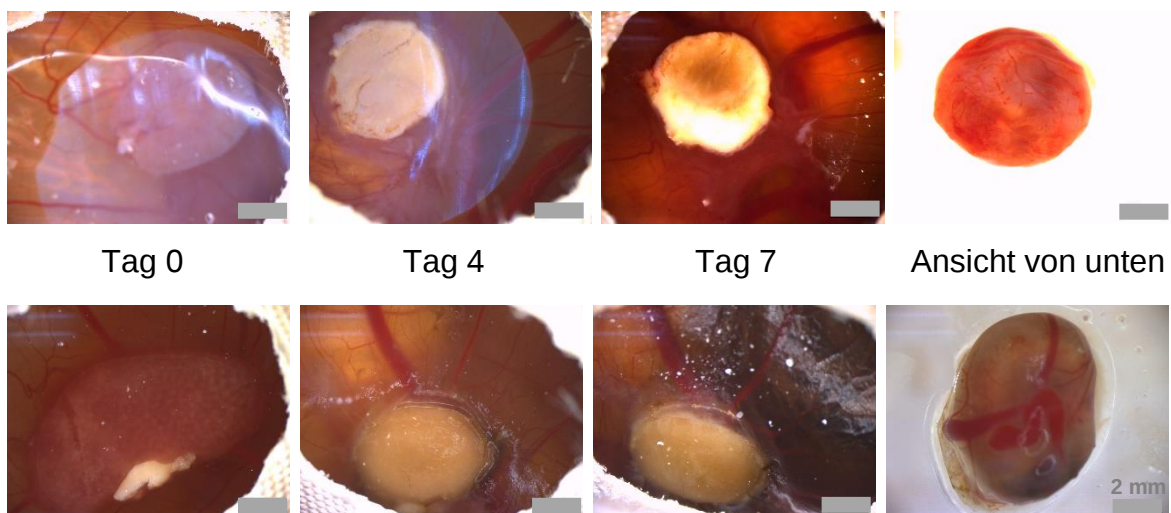


Abb. 12: Nierenschnitte mit Cellophan (oben) und Längsschnitte mit Kapsel (unten)

Morphologische Veränderungen im Zeitverlauf bis zur Exokulation. Maßstab 2 mm.

Ähnlich gut schnitten Frischhaltefolie, Matrigel und Agarosescheibe mit jeweils 8 Punkten ab (**Abb. 13**). Abzüge gab es bei der Frischhaltefolie v. a. für die schlechte Überlebensfähigkeit und für die schwierige Lösbarkeit trotz des täglichen Abziehens zur Behandlung und Anfeuchtung der Nierenschnitte. Bei den mit Matrigel bedeckten Nieren waren insbesondere die Immobilisation, Transparenz und Feuchte nicht optimal. Bei der Bedeckung mit Agarosescheibe fiel auf, dass sich die Agarose ab Tag 2 verfärbte und zunehmend austrocknete und schrumpfte, wodurch die Niere nur mäßig befeuchtet blieb, nicht gut zu behandeln war und die Agarosescheibe weder transparent noch gut lösbar war.

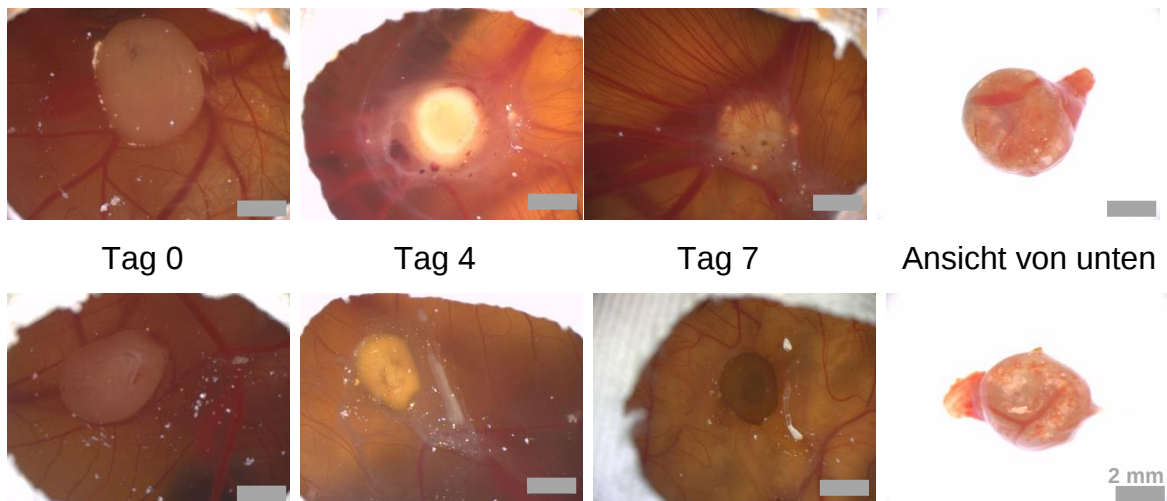


Abb. 13: Nierenschnitte mit Agarosescheibe (oben) und Matrigel (unten)
Morphologische Veränderungen im Zeitverlauf bis zur Exokulation. Maßstab 2 mm.

Scores im mittleren Bereich wiesen Deckgläschen, Agarosering, Gartenvlies und Gaze mit 6 Punkten und etwas besser Vlies, Aclarfolie und Folie mit 7 Punkten auf (**Abb. 14**). Die Immobilisation der Schnitte funktionierte bei allen Abdeckungen recht gut, Vlies, Gartenvlies, Agarosering und Gaze waren für eine Beobachtung der Nierenschnitte nicht transparent genug. Deckgläschen, Aclarfolie und Folie sorgten dadurch, dass sie so fest an der CAM und Niere anhafteten, für eine reduzierte Behandelbarkeit und ebenso wie Gartenvlies und Gaze für eine schwierige Lösbarkeit bei der Exokulation. Im Gegensatz zur Bedeckung mit Schwamm und Cellophan vertrockneten die Nieren bei allen anderen Abdeckungen über die Zeit sehr stark. Besonders schlecht schnitten in sämtlichen Kriterien Filter und Eppendorf-Deckel mit 3 bzw. 2 Punkten ab.

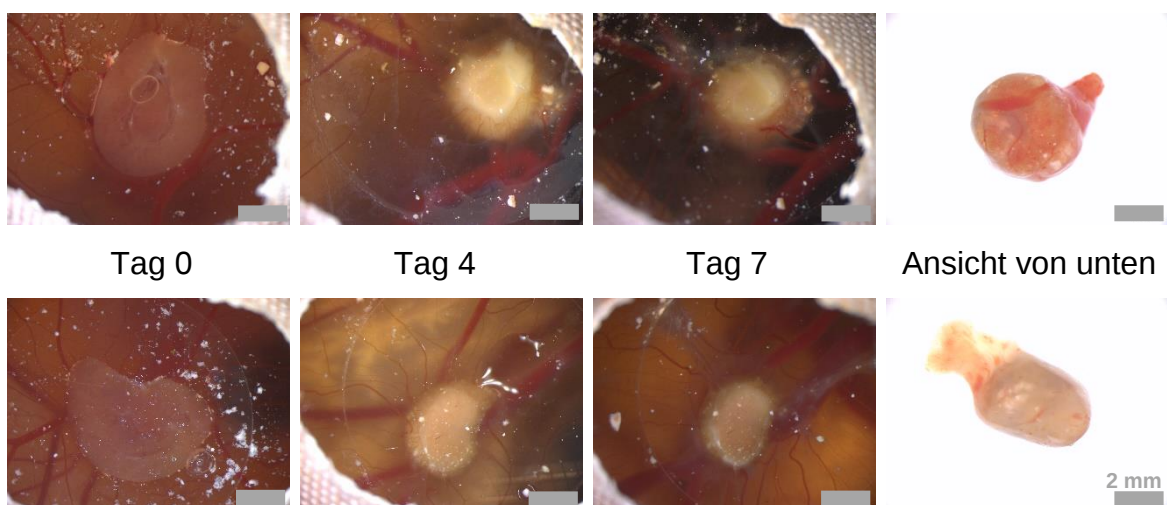


Abb. 14: Nierenschnitte mit Deckgläschen (oben) und Aclarfolie (unten)
Morphologische Veränderungen im Zeitverlauf bis zur Exokulation. Maßstab 2 mm.

Testweise wurden einige Schnitte, bedeckt mit Frischhaltefolie und Cellophan, mit unterschiedlicher Menge an RPMI-Medium behandelt. Sowohl bei der Behandlung mit 50 µl pro Tag als auch mit 100 µl alle 2 Tage zerfiel das Gewebe jedoch beim Ablösen der Folie.

In den Versuchsansätzen mit einem Ring um die Niere konnten die Schnitte besser feucht und immobilisiert gehalten werden konnten, so dass für die Nierenschnitte ohne Abdeckung mit Ring (Score von 11), Frischhaltefolie mit Ring (10), Matrigel mit Ring (10) und Längsschnitt mit Kapsel und Ring (10) eine Verbesserung des Scores verglichen mit der Kultivierung ohne Ring erreicht wurde (**Abb. 15 und 16**). Kollagen mit Ring schnitt mit einem Score von 10 Punkten ebenfalls gut ab. Lediglich beim Cellophan führte ein Ring zu einer schlechteren Lösbarkeit der Folie.

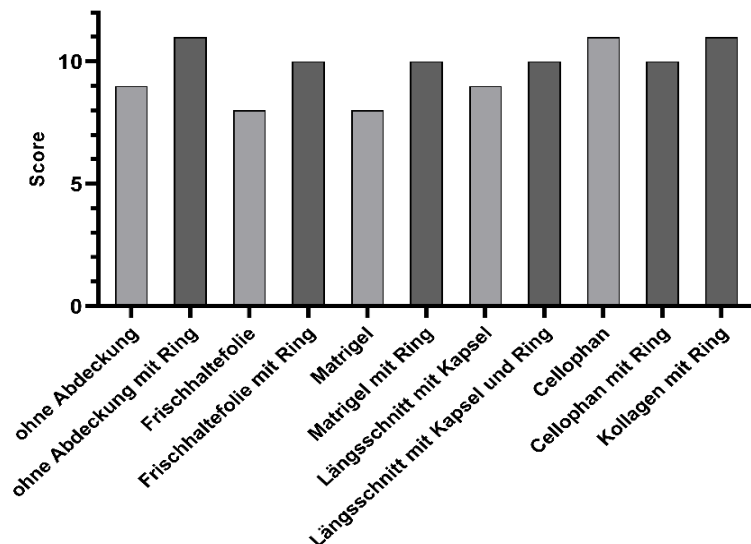


Abb. 15: Makroskopischer Beurteilungsscore der Nierenschnitte mit und ohne Ring

Die Beurteilung der Nierenschnitte mit Ring erfolgte anhand definierter Kriterien mit einer maximalen Punktzahl von 12 Punkten. Es ist jeweils der Vergleich zur Abdeckung ohne Ring dargestellt (n = 45).

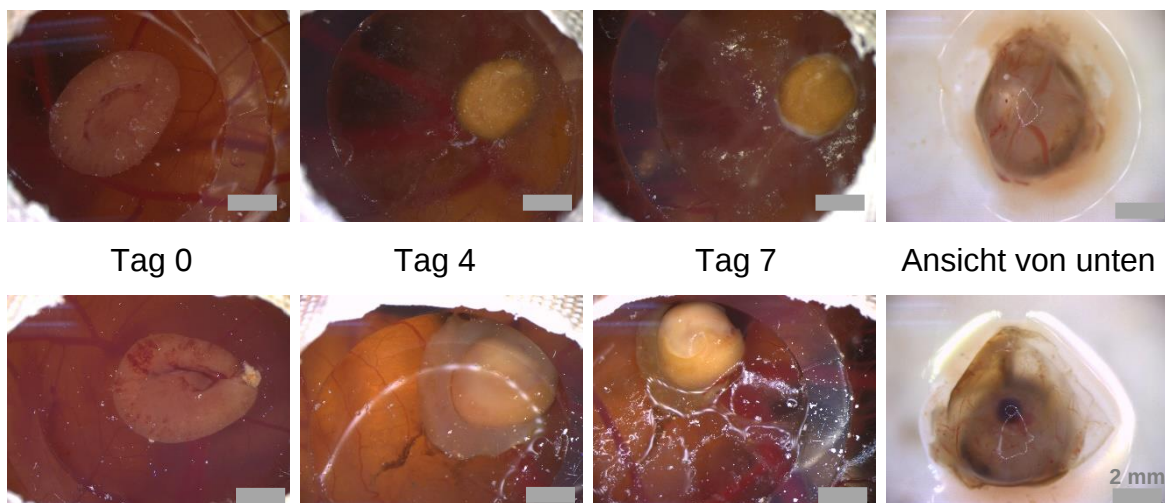


Abb. 16: Nierenschnitte ohne Abdeckung mit Ring (oben) und mit Kollagen und Ring (unten): Morphologische Veränderungen im Zeitverlauf bis zur Exokulation. Maßstab 2 mm.

Einen Überblick über die Punkteverteilung der verschiedenen Abdeckungen gibt **Tabelle 10**.

	Immob.	Transp.	Beh.	Feuchte	Überleb.	Lösb.	Summe
Ohne Abdeckung	1	2	2	0	2	2	9
Vlies	2	0	1	1	2	1	7
Deckgläschen	2	2	0	0	2	0	6
Aclarfolie	2	2	0	0	2	1	7
Folie	2	2	0	0	2	1	7
Agarosering	2	0	2	0	2	0	6
Agarosescheibe	2	1	1	1	2	1	8
Gartenvlies	2	0	1	1	2	0	6
Gaze	2	0	1	1	2	0	6
Filter	3	0	0	0	1	0	3
Matrigel	0	1	2	1	2	2	8
Eppendorfdeckel	0	1	1	0	0	0	2
Längsschnitt mit Kapsel	1	2	2	1	1	2	9
Frischhaltefolie	2	2	2	1	0	1	8
Schwamm	2	0	2	2	1	2	8
Cellophan (mit Wechsel)	2	2	2	2	1	2	11
Cellophan (ohne Wechsel)	2	2	2	1	1	1	9
Ohne Abdeckung mit Ring	2	2	2	1	2	2	11
Frischhaltefolie mit Ring	2	2	2	2	1	1	10
Matrigel mit Ring	2	1	2	2	1	2	10
Längsschnitt mit Kapsel und Ring	2	2	2	1	1	2	10
Cellophan mit Ring (mit Wechsel)	2	2	2	2	1	1	10
Kollagen mit Ring	2	2	2	1	1	2	10

Tabelle 10: Beurteilung der Versuchsbedingungen

Alle getesteten Abdeckungen wurden anhand von 6 Kriterien in ihrer Eignung mit 0 bis 2 Punkten beurteilt (Immobilisation, Transparenz, Behandelbarkeit, Feuchte, Überlebensfähigkeit, Lösbarkeit), woraus sich ein Summenwert von maximal 12 Punkten ergab.

3.4 Vergleich der verschiedenen Abdeckungen nach 7 Tagen

In den ersten Versuchsreihen wurden Nierenschnitte für eine Versuchsdauer von 7 Tagen kultiviert und dabei unter verschiedene zu testende Abdeckungen gelegt (**Abb. 17**). Neben der allgemeinen makroskopischen Bewertung wurden die Präparate nach den zuvor definierten Beurteilungskriterien histologisch ausgewertet, um mögliche Kandidaten für ein optimales Wachstum auf der CAM zu finden.

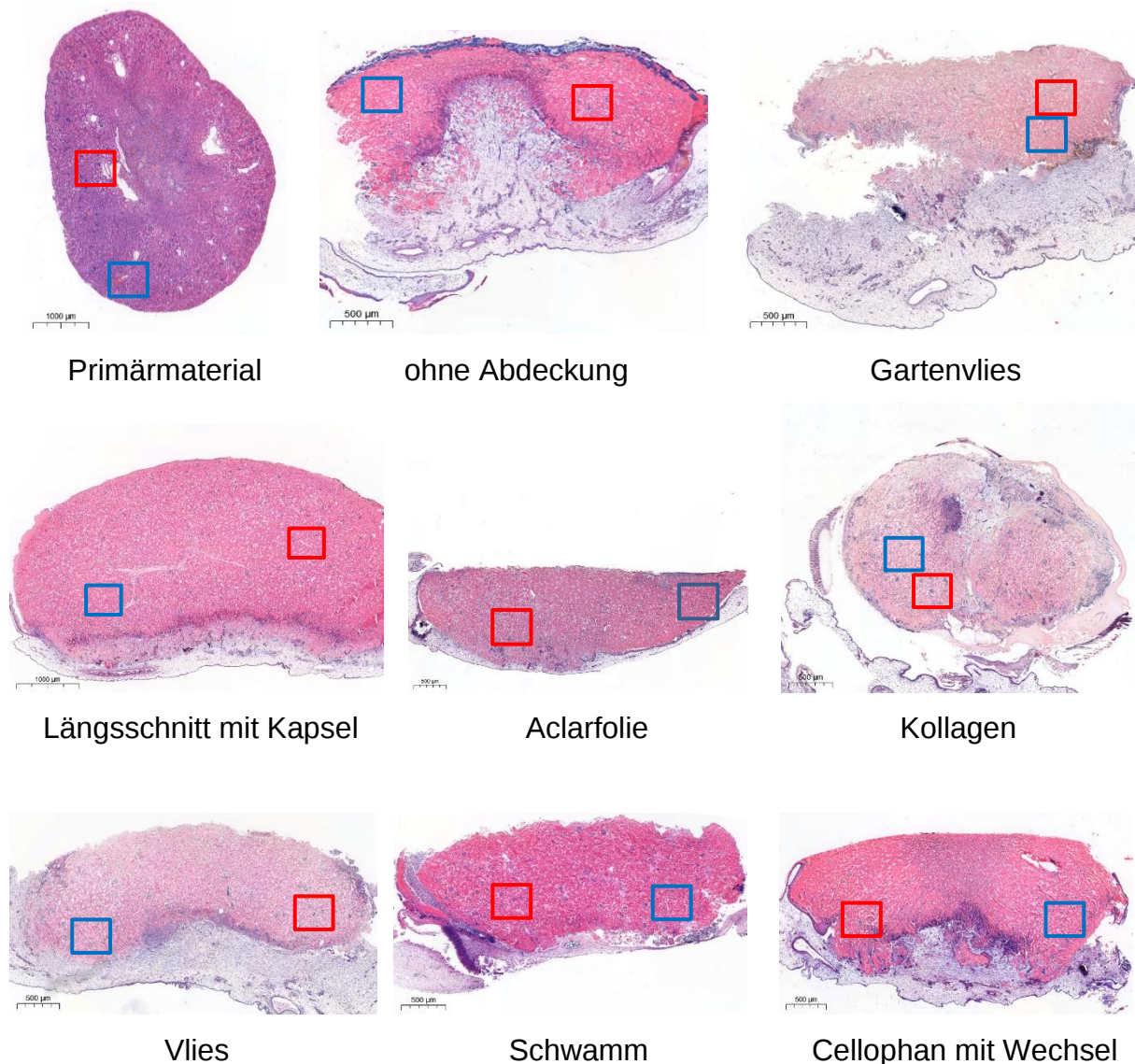


Abb. 17: Exemplarische Nierenschnitte nach 7 Tagen in der Übersicht

Die HE-Bilder zeigen exemplarische Nierenschnitte mit verschiedenen Abdeckungen in der Übersicht (Vergrößerung 1,2–2) mit markierten glomerulären (rot) und tubulointerstitiellen (blau) Ausschnitten, die in den **Abb. 19, 20, 22** und **23** vergrößert dargestellt werden. Alle Nieren sind an der CAM angewachsen, stellenweise ist die Niere durch das Entfernen der Abdeckung bei der Exokulation abgerissen. Maßstab 1000 µm bzw. 500 µm.

3.4.1 Glomeruläre Schädigung nach 7 Tagen

In der histologischen Analyse der HE-gefärbten Präparate der verschiedenen Abdeckungen konnte eine unterschiedlich ausgeprägte Schädigung der Nierenkörperchen nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurde Primärmaterial untersucht, in dem sich physiologische Glomeruli mit großen, gleichmäßig geformten, intakten Zellkernen ohne Atypiezeichen und einem freien Kapselraum vorfanden und einzelne Erythrozyten in den Kapillarschlingen zu sehen waren (**Abb. 19**). Nach 7 Tagen Kultivierungszeitraum waren unter allen Abdeckungen die Zellularität der Glomeruli reduziert sowie atypisch veränderte Zellkerne nachweisbar. Der Kapselraum wies eine unterschiedlich ausgeprägte Füllung und Erweiterung auf. Teilweise befanden sich einzelne Glomeruli in Auflösung.

Die semiquantitative Bewertung der glomerulären Schädigung anhand des Schädigungsscores erlaubte eine vergleichende Einschätzung der Abdeckungen (**Abb. 18**).

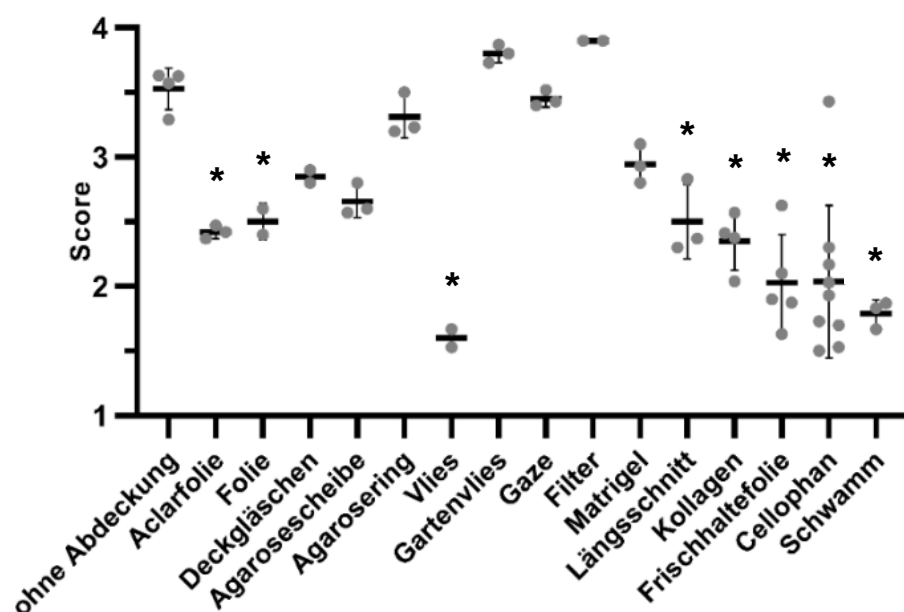


Abb. 18: Glomerulärer Schädigungsscore für alle Abdeckungen

Im Diagramm sind die glomeruläre Schädigungsscores der verschiedenen Abdeckungen als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung gezeigt. Insgesamt wurden 54 Schnitte ausgewertet (ohne Abdeckung: $n = 4$; Aclarfolie: $n = 3$; Folie: $n = 2$; Deckgläschen: $n = 2$; Agarosescheibe: $n = 3$; Agarosering: $n = 3$; Vlies: $n = 2$; Gartenvlies: $n = 3$; Gaze: $n = 3$; Filter: $n = 3$; Matrigel: $n = 3$; Längsschnitt: $n = 3$; Kollagen: $n = 4$; Frischhaltefolie: $n = 5$; Cellophan: $n = 9$; Schwamm: $n = 3$). * steht für signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kultivierung ohne Abdeckung ($p < 0,05$).

Verglichen mit der Kultivierung ohne Abdeckung, bei der sich eine ausgeprägte Schädigung der Glomeruli zeigte, was zu einem hohen Gesamtscore ($3,5 \pm 0,2$) führte, schnitten Deckgläschen ($2,9 \pm 0,07$), Agarosescheibe ($2,7 \pm 0,1$), Agarosering ($3,3 \pm 0,2$), Gaze ($3,5 \pm 0,06$), und Matrigel ($2,9 \pm 0,2$) ähnlich schlecht und Gartenvlies ($3,8 \pm 0,07$) sowie Filter ($3,9 \pm 0,0$) schlechter ab.

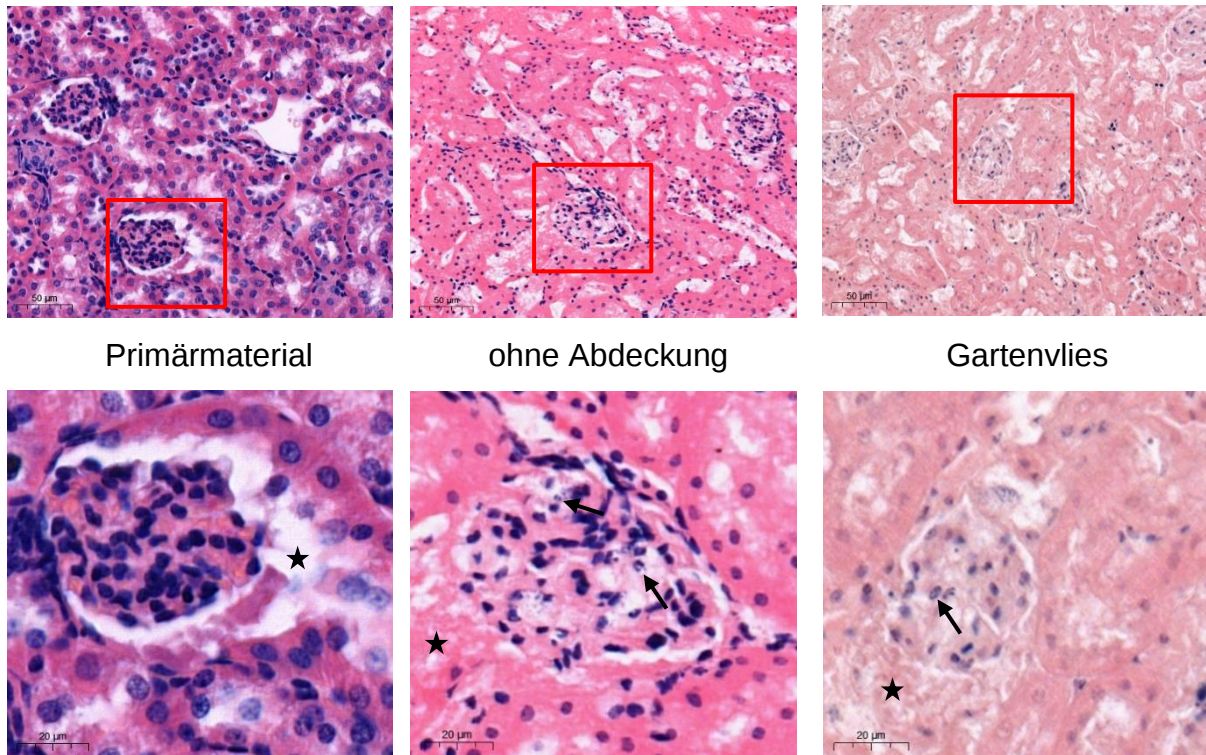
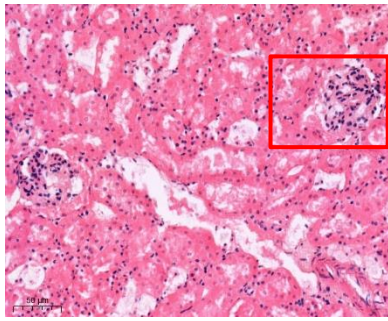
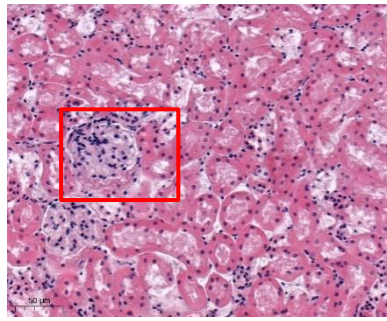


Abb. 19: Glomeruläre Ausschnitte in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) von Primärmaterial und Nierenschnitten ohne Abdeckung und mit Gartenvlies
Es fallen eine reduzierte Zellularität der Glomeruli, vermehrt atypische Zellkerne (→) und eine starke Füllung des Kapselraumes (★) im Vergleich zum Primärmaterial auf. Maßstab 50 µm (oben) bzw. 20 µm (Bildausschnitt unten).

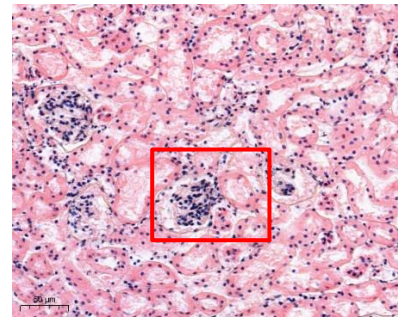
Ein geringeres Schädigungsausmaß wiesen Folie ($2,5 \pm 0,14$; $p = 0,05$) und die Kultivierung als Längsschnitt ($2,5 \pm 0,3$; $p = 0,01$) mit der natürlichen Kapsel als Schutz auf, noch besser waren Aclarfolie ($2,4 \pm 0,05$; $p = 0,005$) und Kollagen ($2,3 \pm 0,2$; $p = 0,0007$; **Abb. 20**). Am besten schnitten die Bedeckung mit Vlies ($1,6 \pm 0,1$), Frischhaltefolie ($2,0 \pm 0,4$), Cellophan ($2,0 \pm 0,6$) und Schwamm ($1,8 \pm 0,1$) ab (jeweils $p < 0,0001$). Untereinander unterschieden sich diese 4 Kandidaten nicht signifikant ($p > 0,92$), wobei bei den mit Frischhaltefolie und Cellophan bedeckten Nierenschnitten jedoch eine besonders große Streuung auffiel. Alle von ihnen wiesen in einzelnen Schnitten Scoringwerte von minimal 1,5–67 auf. Dies entspricht einer Reduktion der Zellularität um ca. 15–20 % und einem Anteil an atypischen Zellkernen im Glomerulus von 10–15 %.



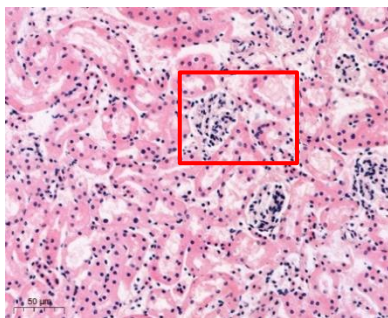
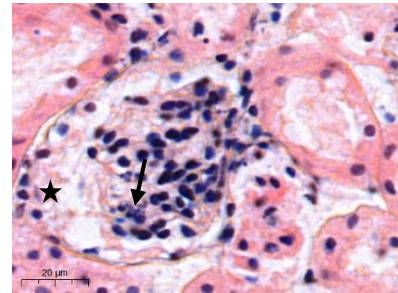
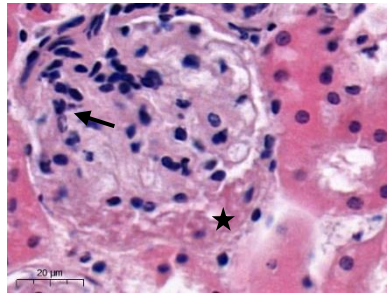
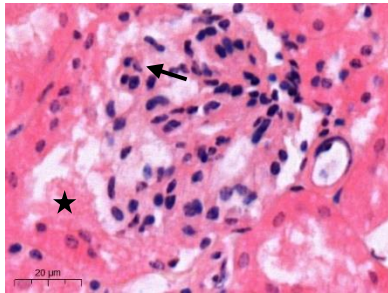
Längsschnitt mit Kapsel



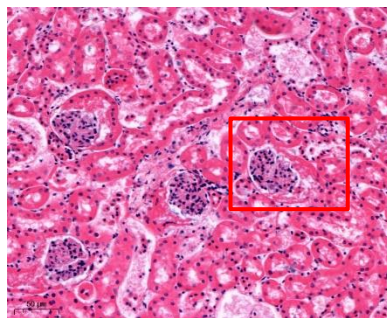
Aclarfolie



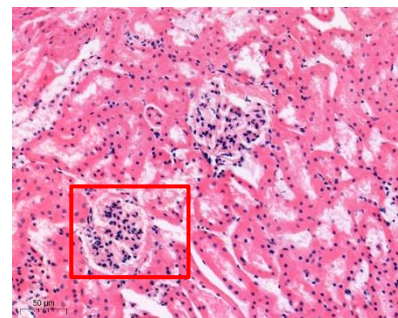
Kollagen



Vlies



Schwamm



Cellophan (mit Wechsel)

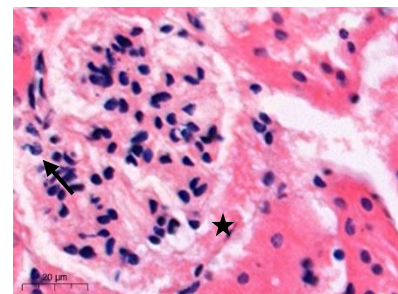
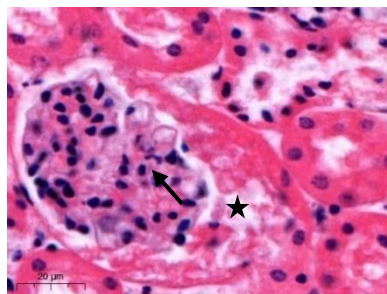
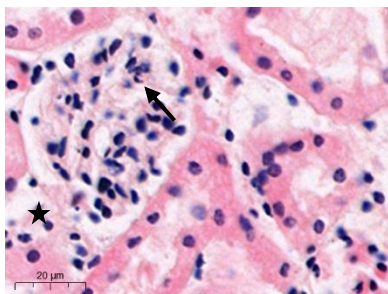


Abb. 20: Glomeruläre Ausschnitte in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) von einem Längsschnitt mit Kapsel sowie Nierenschnitten mit Aclarfolie, Kollagen, Vlies, Schwamm und Cellophan (mit Wechsel)

Verglichen mit **Abb. 19** sind die Glomeruli besser erhalten: Die Zellularität ist weniger reduziert, es kommen weniger atypische Zellkerne (—————>) vor und die Füllung des Kapselraumes (★) ist nicht so ausgeprägt. Maßstab 50 µm (oben) bzw. 20 µm (Bildausschnitt unten).

3.4.2 Tubulointerstitielle Schädigung nach 7 Tagen

Eine Schädigung des tubulointerstitiellen Kompartiments war in allen Präparaten zu sehen. Im Vergleich zum Primärmaterial, in dem sich normale Tubuli mit regelmäßig angeordneten Zellkernen, einer gut abgrenzbaren Zell-Lumengrenze und Mikrovilli auf dem apikalen Zellpol befinden (**Abb. 22**), waren in den kultivierten Nieren der Verlust und Veränderungen von Zellkernen im Tubulusepithel sowie aufgelöste Epithelzellen nachweisbar. Interstitiell zwischen den Tubuli sowie im Tubuluslumen war Zelldetritus zu sehen. Ebenfalls war eine Erweiterung und Füllung des Tubuluslumens mit hyalinem Material und Mikrovilli erkennbar. Einzelne Tubuli wirkten atroph, was durch eine Abflachung des Epithels und eine erschwerte Abgrenzbarkeit der Zell-Lumengrenze deutlich wurde.

Analog zur Einschätzung der glomerulären Schädigung wurde anhand des definierten Scores der Zustand des Tubulointerstitiums beurteilt und so die verschiedenen getesteten Abdeckungen einander gegenübergestellt (**Abb. 21**): Verglichen mit der Lagerung ohne Abdeckung ($3,7 \pm 0,05$) wurde in den Nierenschnitten mit Deckgläschen ($3,3 \pm 0,04$; $p = 0,66$) eine ähnliche Schädigung erfasst, mit Agarosescheibe ($3,6 \pm 0,09$), Agarosering ($3,8 \pm 0,06$), Gartenvlies ($3,9 \pm 0,04$), Gaze ($3,8 \pm 0,05$), Filter ($4,0 \pm 0,0$) und Matrigel ($4,0 \pm 0,0$) eine stärkere Schädigung ($p > 0,98$; **Abb. 22**).

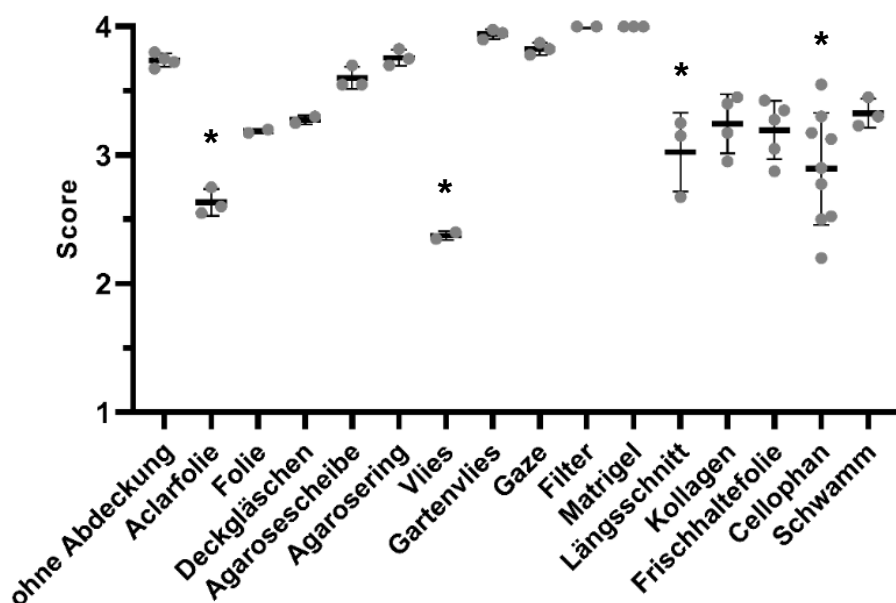


Abb. 21: Tubulointerstitieller Schädigungsscore für alle Abdeckungen

Im Diagramm sind die tubulointerstitiellen Schädigungsscores für alle getesteten Abdeckungen als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben ($n = 54$). * steht für signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kultivierung ohne Abdeckung ($p < 0,05$).

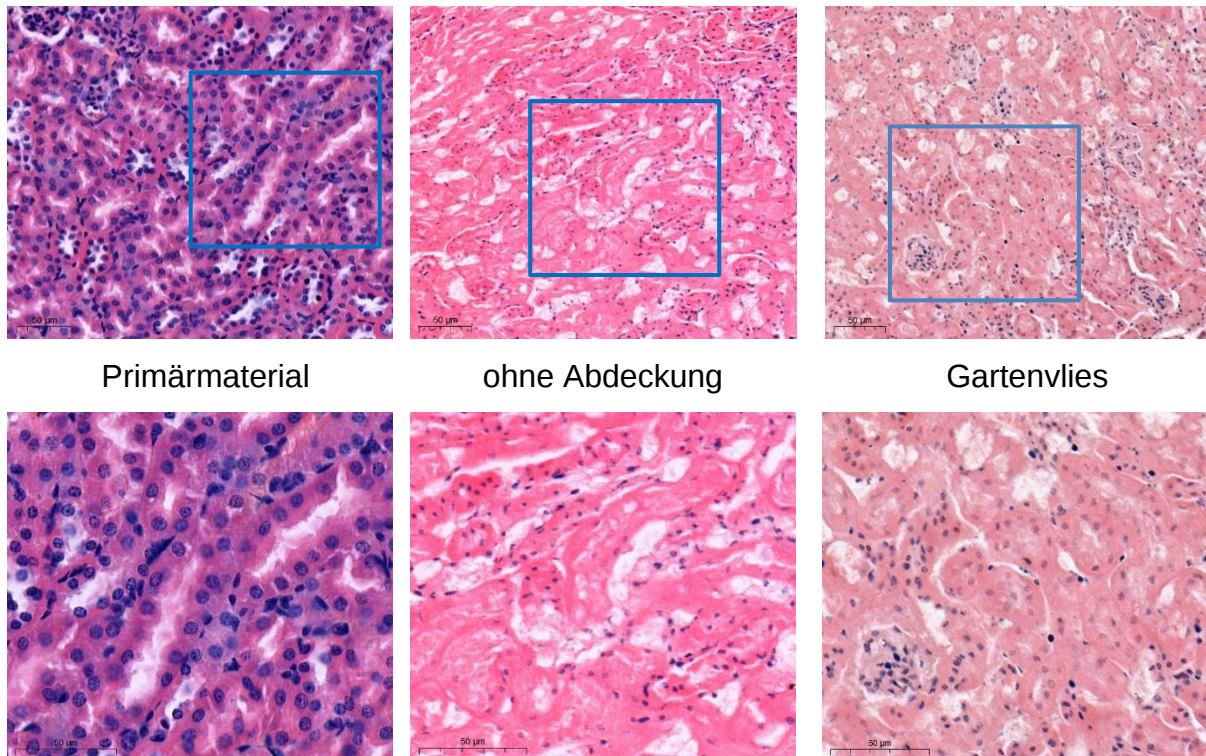
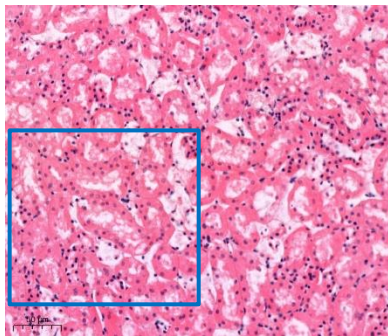


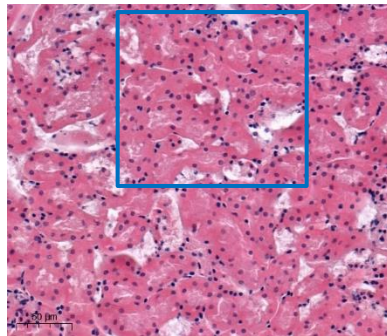
Abb. 22: Tubulointerstitielle Ausschnitte in 20facher (oben) und 40facher Vergrößerung (unten) von Primärmaterial und Nierenschnitten ohne Abdeckung und mit Gartenvlies

Verglichen mit dem Primärmaterial sind in den anderen Präparaten deutliche tubulointerstitielle Schäden zu sehen: Die Anzahl der Zellkerne hat sichtbar abgenommen, zudem ist das Tubulusepithel abgeflacht und vom deutlich gefüllten Tubuluslumen kaum abgrenzbar. Maßstab 50 µm.

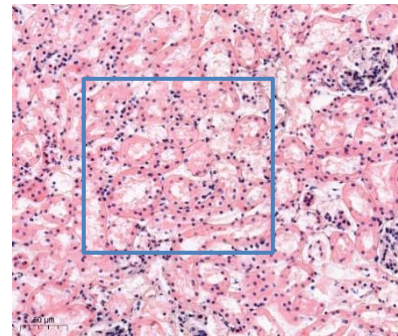
Ein besser erhaltenes Tubulointerstitium wiesen neben dem Längsschnitt mit natürlicher Kapsel ($3,0 \pm 0,3$; $p = 0,03$) allen voran Aclarfolie ($2,6 \pm 0,1$), Vlies ($2,4 \pm 0,04$) und Cellophan ($2,9 \pm 0,4$) auf ($p < 0,0001$; **Abb. 23**). Folie ($3,2 \pm 0,02$; $p = 0,39$), Kollagen ($3,2 \pm 0,2$; $p = 0,25$), Frischhaltefolie ($3,2 \pm 0,2$; $p = 0,09$) und Schwamm ($3,3 \pm 0,1$; $p = 0,65$) waren laut Scoringwert nicht signifikant besser als ohne Abdeckung (**Abb. 23**). Ein Vergleich der besten Kandidaten zeigt, dass Vlies signifikant besser abschnitt als Frischhaltefolie ($p = 0,02$) und Schwamm ($p = 0,008$), ansonsten gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Präparate mit minimaler Schädigung wiesen Cellophan mit einem Score von 2,2 und Vlies mit 2,35 auf, was einer Rate von ca. 10 % abnormalen oder aufgelösten Zellkernen sowie 15–20 % interstitiellem Zelldetritus entspricht.



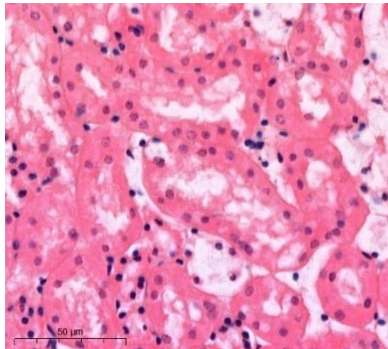
Längsschnitt mit Kapsel



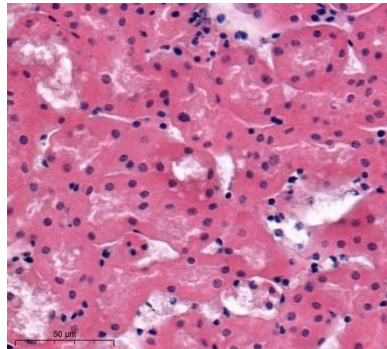
Aclarfolie



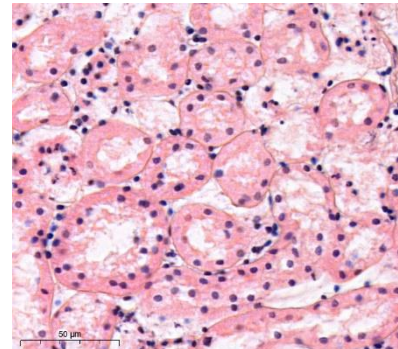
Kollagen



Vlies



Schwamm



Cellophan mit Wechsel

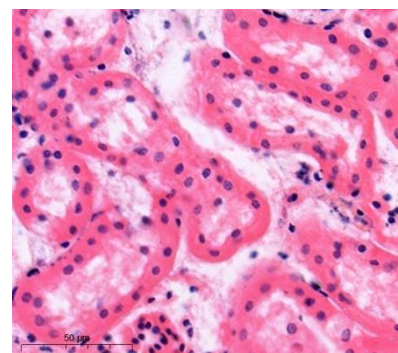
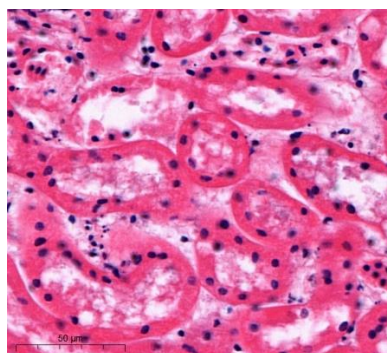
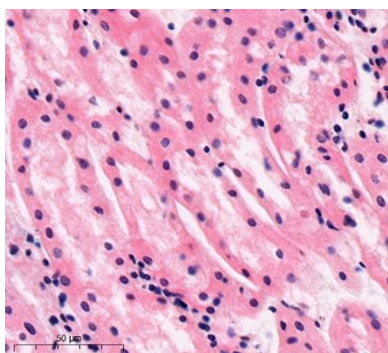
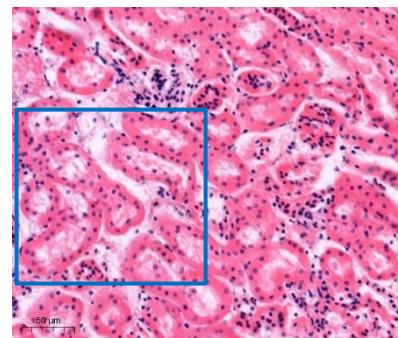
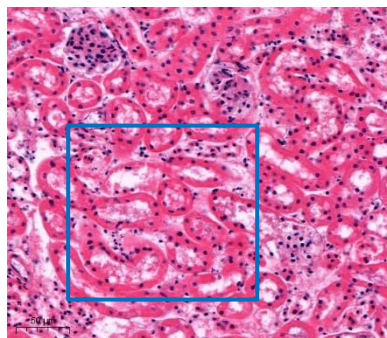
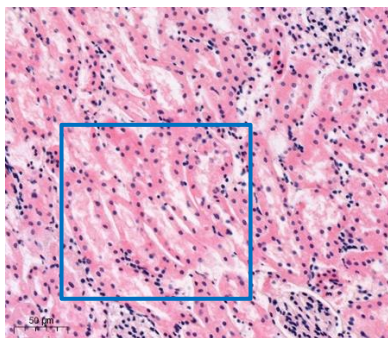


Abb. 23: Tubulointerstitielle Ausschnitte in 20facher (oben) und 40facher Vergrößerung (unten) von einem Längsschnitt mit Kapsel sowie Nierenschnitten mit Aclarfolie, Kollagen, Vlies, Schwamm und Cellophan mit Wechsel

Das Tubulointerstitium ist im Vergleich zu den Nierenschnitten in **Abb. 22** deutlich besser erhalten: Die Tubuli weisen deutlich mehr Zellkerne und eine geringer ausgeprägte Epithelabflachung auf. Das Tubuluslumen ist zudem nur gering mit hyalinem Material gefüllt. Maßstab 50 µm.

3.4.3 CAM-Übergang nach 7 Tagen

In allen Schnitten mit sämtlichen verschiedenen Abdeckungen konnte an der Verwachsungszone zwischen der Niere und CAM ein Bereich identifiziert werden, an dem sich die Tubuli und Glomeruli in Auflösung befanden und größtenteils keine Zellkerne mehr aufwiesen. Zudem war eine Ansammlung mit monomorphen Zellkernen und einzelnen Hühnererythrozyten zu erkennen (**Abb. 25**). Das Ausmaß dieser Reaktion am CAM-Übergang war bei den Schnitten mit einer Lagerung ohne Abdeckung stark ausgeprägt. Im Vergleich dazu fanden sich bei den meisten anderen Abdeckungen keine signifikanten Unterschiede (ohne Abdeckung $3,6 \pm 0,3$; Folie $2,3 \pm 0,0$; Deckgläschen $2,1 \pm 0,0$; Agarosescheibe $2,2 \pm 0,4$; Agarosering $2,7 \pm 0,1$; Gartenvlies $3,5 \pm 0,2$; Gaze $2,2 \pm 0,3$; Filter $3,1 \pm 0,4$; Matrigel $2,3 \pm 0,9$; Längsschnitt $2,9 \pm 0,6$; Kollagen $3,0 \pm 0,5$; Frischhaltefolie $3,2 \pm 0,7$; Cellophan $2,7 \pm 0,8$; Schwamm $3,0 \pm 0,7$; $p > 0,17$; **Abb. 24**). Signifikant geringer ausgeprägt war die Schädigung am CAM-Übergang lediglich bei den Nierenschnitten mit Aclarfolie und Vlies (Aclarfolie $1,6 \pm 0,4$, $p = 0,005$; Vlies $1,6 \pm 0,04$, $p = 0,03$ im Vergleich zu ohne Abdeckung; **Abb. 24**). Auffällig waren die ausgeprägten Schwankungen zwischen Präparaten mit derselben Abdeckung, so dass trotz der nicht-signifikanten Unterschiede der Mittelwerte einzelne Schnitte einen Score ≤ 2 aufwiesen, was einer Ausdehnung des zellkernfreien Areals von $< 10\%$ der Ausdehnung entspricht. Dies waren Schnitte mit einer Agarosescheibe, in Matrigel, unter Frischhaltefolie sowie Cellophan (Agarosescheibe 1,95; Matrigel 1,3; Frischhaltefolie 2,0; Cellophan 1,95).

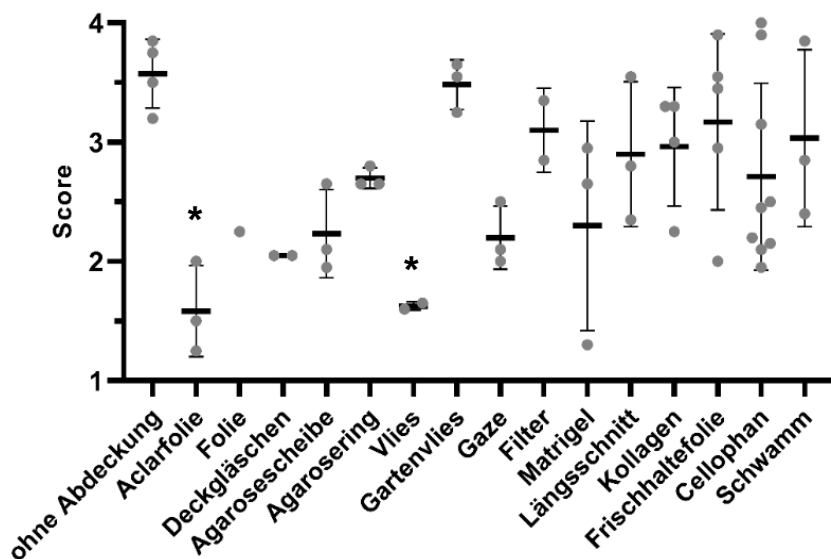
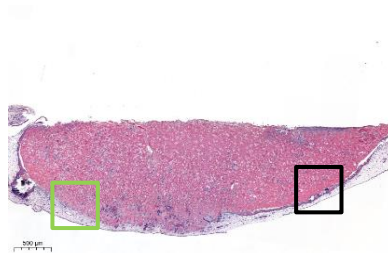


Abb. 24: Schädigungsausmaß am CAM-Übergang

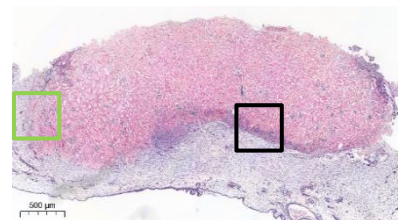
Das Diagramm zeigt die ermittelten Schädigungsscores für den CAM-Übergang für alle Abdeckungen als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($n = 53$). * steht für signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kultivierung ohne Abdeckung ($p < 0,05$).



Ohne Abdeckung



Aclarfolie



Vlies

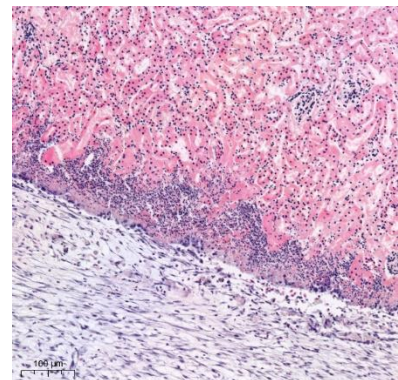
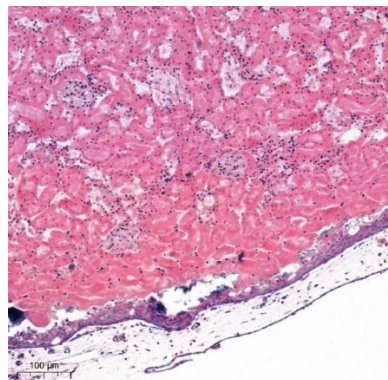
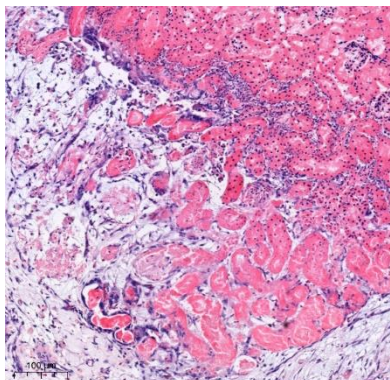
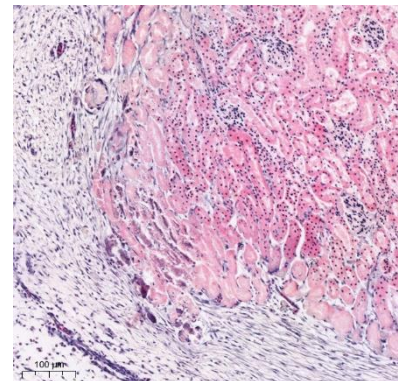
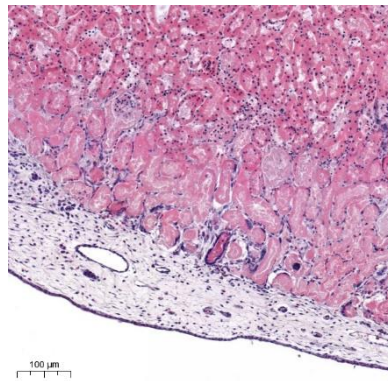
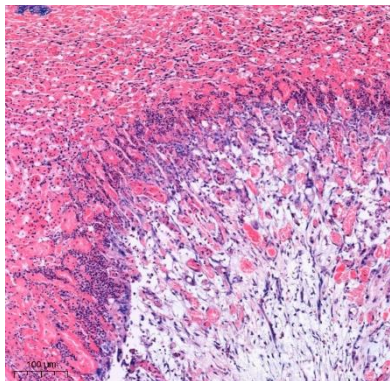


Abb. 25: CAM-Übergang in verschiedenen Nierenschnitten

Exemplarisch sind HE-Bilder von Nierenschnitten ohne Abdeckung, mit Aclarfolie und mit Vlies dargestellt. Unter dem jeweiligen Übersichtsbild in 1,2–2facher Vergrößerung (oben) sind jeweils zwei Ausschnitte in 10facher Vergrößerung (grüner Ausschnitt in Mitte und schwarzer Ausschnitt unten) darstellt. Es ist eine unterschiedliche ausgeprägte Schädigungszone am Übergang zwischen Niere und CAM in Form von autolytischen Glomeruli und Tubuli zu sehen, zudem finden sich viele monomorphe Zellkerne und einzelne Hühnererythrozyten. Maßstab 500 µm (oben) bzw. 100 µm (Bildausschnitte in der Mitte und unten).

3.4.4 Oberflächliche Schädigung nach 7 Tagen

Eine Schädigung der oberflächlichen, zur Luft gelegenen Seite der Nieren konnte in sämtlichen Präparaten nachgewiesen werden (**Abb. 27**). Im Vergleich zu den Nierenschnitten, die ohne Abdeckung kultiviert wurden, zeigte sich lediglich bei den Längsschnitten, die zur Luftseite hin durch ihre natürliche, intakte Kapsel geschützt waren, eine besser erhaltene Oberfläche und damit ein geringerer Schädigungsscore (ohne Abdeckung: $3,4 \pm 0,2$ vs. Längsschnitt $1,3 \pm 0,1$; $p = 0,01$; **Abb. 26**). Die restlichen Abdeckungen unterschieden sich im Ausmaß der oberflächlichen Schädigung im Score nicht signifikant von der Lagerung ohne Abdeckung (Aclarfolie $2,1 \pm 0,2$; Folie $2,1 \pm 0,0$; Deckgläschen $2,9 \pm 0,5$; Agarosescheibe $2,6 \pm 1,0$; Agarosering $2,6 \pm 0,6$; Vlies $2,5 \pm 0,2$; Gartenvlies $4,0 \pm 0,03$; Gaze $3,5 \pm 0,0$; Filter $4,0 \pm 0,0$; Matrigel $3,6 \pm 0,7$; Kollagen $3,6 \pm 0,2$; Frischhaltefolie $2,8 \pm 0,9$; Cellophan $2,5 \pm 0,9$; Schwamm $2,7 \pm 0,1$; $p > 43$ im Vergleich zu ohne Abdeckung; **Abb. 26**). Aufgrund einer teils großen Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe, gab es trotz der insgesamt nicht signifikanten Unterschiede Präparate, bedeckt mit Aclarfolie, Agarosescheibe, Frischhaltefolie sowie Cellophan, die einen Score von ≤ 2 und damit eine oberflächliche Schädigung von unter 10 % der Nierenausdehnung aufwiesen (Aclarfolie 2,0; Agarosescheibe 1,9; Frischhaltefolie 1,9; Cellophan 1,3).

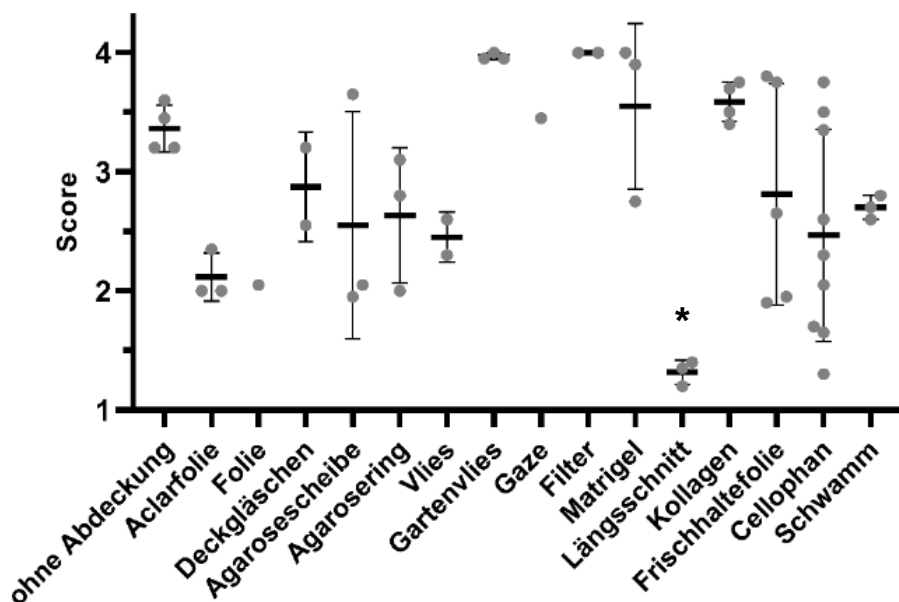


Abb. 26: Schädigungsausmaß an der Oberfläche

Das Diagramm zeigt die ermittelten Schädigungsscores für die oberflächlichen Bereiche der Nierenschnitte für alle Abdeckungen, angegeben als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($n = 51$). * steht für signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kultivierung ohne Abdeckung ($p < 0,05$).

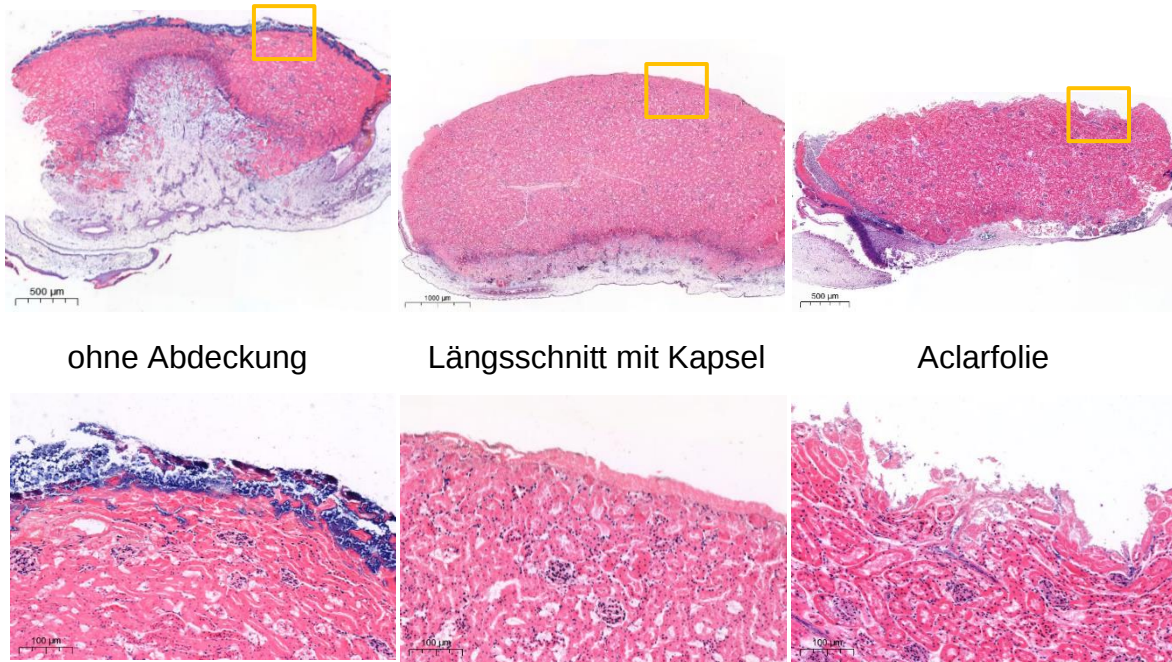


Abb. 27: Oberflächliche Zone in exemplarischen Nierenschnitten

In den HE-Bildern sind exemplarisch ein Nierenschnitt ohne Abdeckung, ein Längsschnitt mit Kapsel und ein Schnitt mit Aclarfolie dargestellt, in der Übersicht (oben, 1,2–2fache Vergrößerung) sowie in 10facher Vergrößerung. Der geschädigte oberflächliche Bereich der Niere ist beim Schnitt ohne Abdeckung ausgedehnter als bei den anderen Präparaten. Maßstab 500 µm bzw. 1000 µm (oben) und 100 µm (unten).

3.5 Zeitverlauf ohne Abdeckung

In zwei Versuchsreihen wurden Nierenquerschnitte ohne Abdeckung für 1 bis 7 Tage kultiviert und täglich durchschnittlich 3 Nieren von der CAM entnommen, um die morphologischen Veränderungen über den Zeitraum einer Woche zu beurteilen (**Abb. 28**).

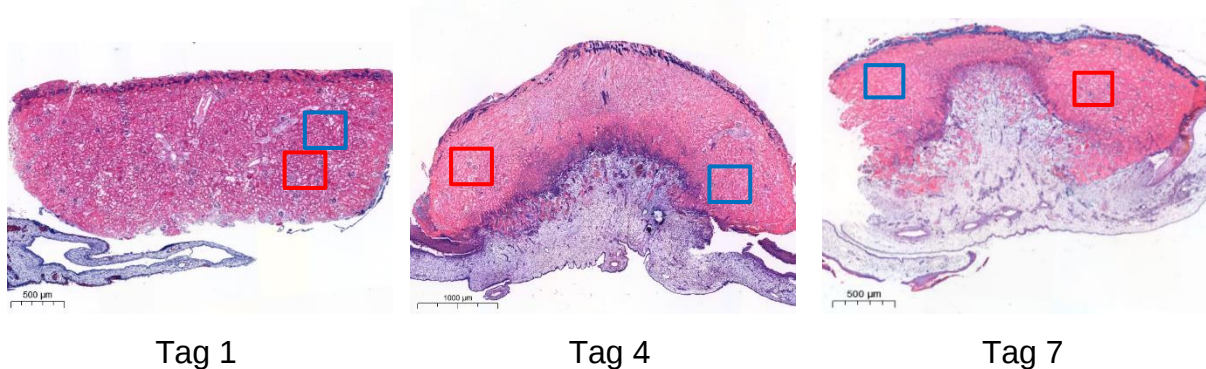
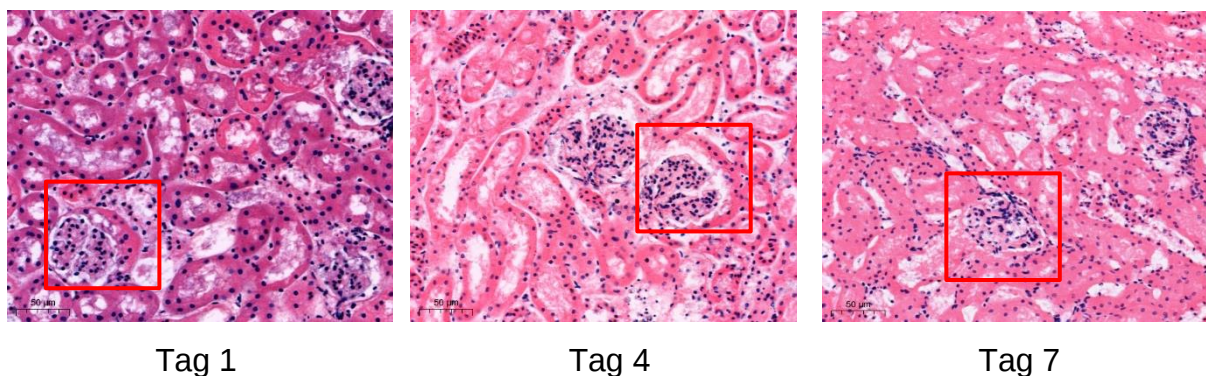


Abb. 28: Exemplarische Nierenschnitte ohne Abdeckung in der Übersicht

Die HE-Bilder zeigen die jeweiligen Nierenschnitte in der Übersicht (Vergrößerung 1,2–2x) mit markierten glomerulären (rot) und tubulointerstitiellen (blau) Ausschnitten, die in den **Abb. 29** und **33** vergrößert dargestellt werden. Maßstab 1000 µm bzw. 500 µm.

3.5.1 Glomeruläre Schädigung im Zeitverlauf

Die histologische Analyse der HE-gefärbten Präparate zeigte eine unterschiedlich ausgeprägte Schädigung der Nierenkörperchen je nach Exokulationstag, wobei über den Versuchszeitraum von einer Woche insgesamt eine Zunahme der Schädigung festgestellt werden konnte. Es kam zunehmend zu einer Verringerung der Zellularität in den Glomeruli, einer Zunahme an morphologisch veränderten Zellkernen und einer zunehmenden Füllung und Erweiterung des Kapselraumes. Die Nierenkörperchen waren zunehmend schlechter von der Umgebung abgrenzbar und zeigten eine Schrumpfung über den Kultivierungszeitraum. An Tag 7 befanden sich einzelne Glomeruli in Auflösung (**Abb. 29**).



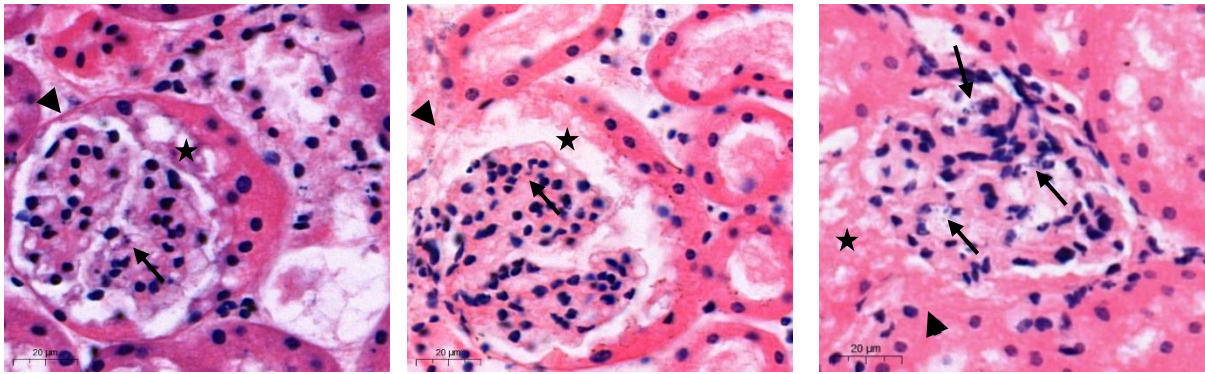


Abb. 29: Glomeruläre Ausschnitte im Zeitverlauf

In den HE-gefärbten Präparaten in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) werden die morphologischen Veränderungen der Glomeruli nach unterschiedlich langer Kultivierungszeit auf der CAM (Tag 1, 4 und 7) deutlich: Eine zunehmende Füllung des Kapselraumes (★), immer mehr atypische Zellkerne (→) sowie eine zunehmende Auflösung und schlechtere Abgrenzbarkeit der Glomeruli (►). Maßstab 50 µm (oben) bzw. 20 µm (unten).

Die morphologischen Veränderungen über die Zeit wurden anhand der glomerulären Beurteilungskriterien als Schädigungsscore semiquantitativ erfasst:

In der Zusammenschau aller Beurteilungskriterien ergab sich innerhalb der ersten 24 Stunden ein signifikant steigender **Gesamtscore** als Zeichen einer schnell zunehmenden glomerulären Schädigung ($0,0 \pm 0,0$ an Tag 0 vs. $1,0 \pm 0,04$ an Tag 1; $p = 0,002$; **Abb. 30**). Bis Tag 4 stieg der Gesamtscore daraufhin nur leicht an ($1,1 \pm 0,1$ an Tag 2 vs. $1,1 \pm 0,1$ an Tag 3 vs. $1,2 \pm 0,3$ an Tag 4; $p > 0,96$). Danach nahm die glomeruläre Schädigung bis Tag 7 kontinuierlich zu, in den letzten 24 Stunden bis zum Versuchsende an Tag 7 kam es dabei zu einer signifikanten Verschlechterung ($1,8 \pm 0,03$ an Tag 5 vs. $2,3 \pm 0,1$ an Tag 6; $p = 0,11$ im Vergleich zu Tag 5 vs. $3,5 \pm 0,10$ an Tag 7; $p = 0,0003$ im Vergleich zu Tag 6; **Abb. 30**).

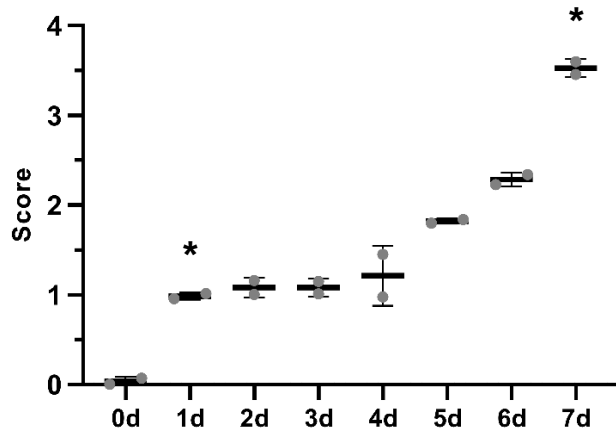


Abb. 30: Gesamtscore der glomerulären Schädigung

Im Diagramm sind die ermittelten glomerulären Schädigungsscores als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Insgesamt wurden 38 Nierenschnitte aus getrennten 2 Versuchen (N=2) ausgewertet (Tag 1: $n = 8$; Tag 2: $n = 7$; Tag 3: $n = 5$; Tag 4: $n = 5$; Tag 5: $n = 5$; Tag 6: $n = 4$; Tag 7: $n = 4$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

Bei getrennter Betrachtung der einzelnen Beurteilungskriterien, die in Summe den glomerulären Schädigungsscore bilden, zeigt sich ein genaueres Bild der morphologischen Veränderungen über den Versuchszeitraum:

Die **Zellularität** der Glomeruli blieb in den ersten 6 Tagen relativ konstant ($62,0 \pm 10,3$ an Tag 0 vs. $60,1 \pm 1,9$ an Tag 1 vs. $59,2 \pm 6,9$ an Tag 2 vs. $60,7 \pm 8,8$ an Tag 3 vs. $65,2 \pm 12,8$ an Tag 4 vs. $55,4 \pm 6,5$ an Tag 5 vs. $52,3 \pm 4,9$ an Tag 6; $p > 0,88$; **Abb. 31**), wobei eine Schrumpfung der Glomeruli über den Versuchszeitraum beobachtet werden konnte. Bis zum Ende des Versuchszeitraums nahm die Anzahl an Zellkerne jedoch signifikant ab ($30,5 \pm 1,3$ an Tag 7; $p = 0,04$ im Vergleich zu Tag 0), was einer Reduktion der Anzahl an Zellkernen um über 50 % im Vergleich zum Primärmaterial entspricht.

Im Verlauf der Versuchswoche traten immer mehr **Zellkernveränderungen** auf. Insgesamt konnte bis Tag 7 eine Zunahme an atypischen Zellkernen von 0 % auf 46 % der Zellkerne festgestellt werden, wobei die Veränderungen v. a. ab Tag 4 auftraten (0 % an Tag 0 vs. $4,1 \pm 0,3$ % an Tag 1 vs. $5,3 \pm 0,2$ % an Tag 2 vs. $6,6 \pm 0,01$ % an Tag 3 vs. $6,1 \pm 0,9$ % an Tag 4; $p > 0,39$ im Vergleich zum jeweiligen Vortag; vs. $14,1 \pm 0,6$ % an Tag 5 mit $p = 0,03$ im Vergleich zu Tag 4; vs. $19,1 \pm 1,2$ % an Tag 6 mit $p = 0,22$ im Vergleich zu Tag 5; vs. $45,6 \pm 4,8$ % an Tag 7 mit $p < 0,0001$ im Vergleich zu Tag 6; **Abb. 31**).

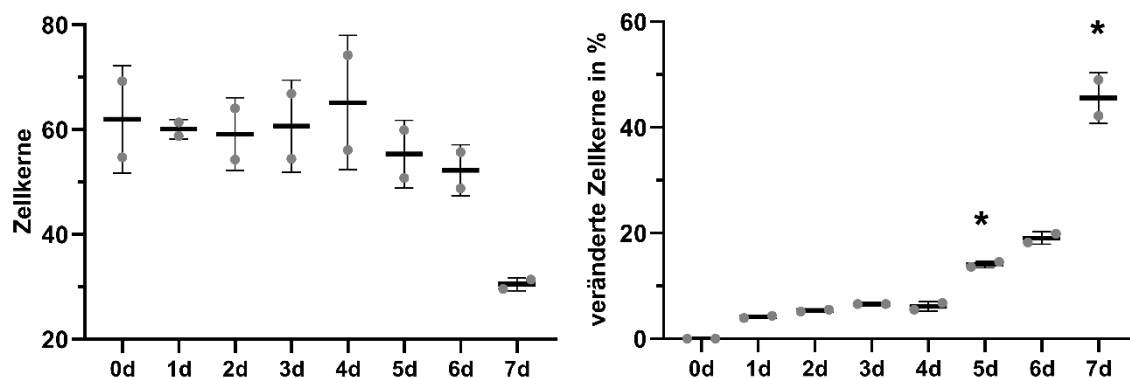


Abb. 31: Glomeruläre Zellularität und Zellkernveränderungen

In den Diagrammen sind die durchschnittliche absolute Anzahl an Zellkernen pro Glomerulus (links) und der prozentuale Anteil an veränderten Zellkernen in Prozent im Zeitverlauf dargestellt, als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. Die Anzahl an Nierenschnitten entspricht der Darstellung in **Abb. 27**. * steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

Die **Füllung des Kapselraumes** mit eosinophilem Material nahm im Versuchsverlauf zu, erkennbar an der signifikanten Zunahme der Füllung, ausgedrückt als Score von 0 bis 4 kam es in den ersten 24 Stunden ($0,02 \pm 0,02$ an Tag 0 vs. $1,3 \pm 0,1$ an Tag 1; $p = 0,01$; **Abb. 32**). Im weiteren Verlauf füllte sich der Kapselraum kontinuierlich ohne signifikantes Ausmaß von Tag zu Tag ($1,4 \pm 0,02$ an Tag 2 vs. $1,6 \pm 0,01$ an Tag 3 vs. $2,1 \pm 0,5$ an Tag 4 vs. $2,8 \pm 0,3$ an Tag 5 vs. $3,1 \pm 0,3$ an Tag 6 vs. $3,9 \pm 0,1$ an Tag 7; $p > 0,07$; **Abb. 32**), aber in der Summe von Tag 1 zu Tag 7 doch signifikant ($p < 0,0001$ im Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7).

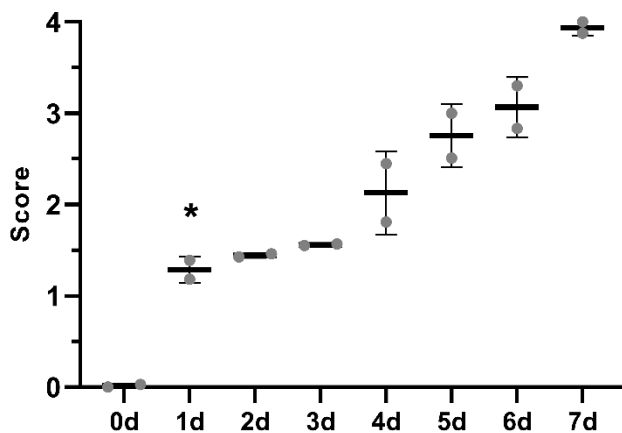


Abb. 32: Füllung des glomerulären Kapselraumes im Zeitverlauf

Das Diagramm stellt die Entwicklung der Füllung im glomerulären Kapselraum über den Versuchszeitraum als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($n = 38$) dar. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

3.6 Tubulointerstitielle Schädigung im Zeitverlauf

Das Tubulointerstitium wies im Zeitverlauf über eine Woche eine deutliche Zunahme an Schädigung auf, wobei bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein Untergang einzelner Tubuli zu sehen war (**Abb. 33**). Über den Versuchszeitraum kam es in den kultivierten Nieren zunehmend zum Verlust und Veränderungen von Zellkernen im Tubulusepithel und zur Auflösung der Epithelzellen. In Folge nahm die Ansammlung von Zelldetritus im interstitiellen Raum zwischen den Tubuli und im Tubuluslumen zu. Das Tubuluslumen war zudem mit hyalinem Material und abgeschilferten Mikrovilli gefüllt und erweitert. Die Tubuli wurden im Verlauf zunehmend atroph, was sich durch eine Abflachung des Epithels und eine erschwerte Abgrenzbarkeit der Zell-Lumengrenze zeigte.

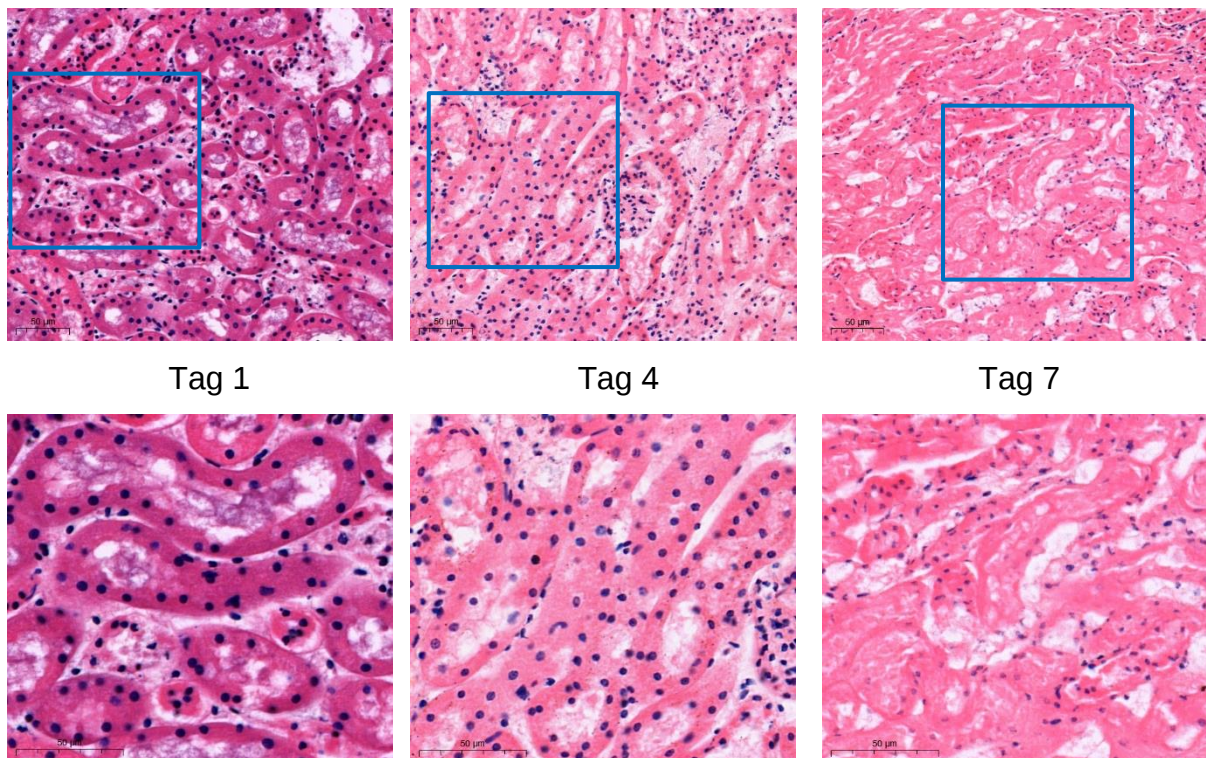


Abb. 33: Tubulointerstitielle Ausschnitte im Zeitverlauf

In den HE-gefärbten Präparaten in 20facher (oben) und 40facher Vergrößerung (unten) werden die morphologischen Veränderungen im tubulointerstitiellen Raum nach unterschiedlich langer Kultivierungszeit auf der CAM (Tag 1, 4 und 7) deutlich: Eine zunehmende Füllung des Tubuluslumen, immer mehr atypische und fehlende Zellkerne sowie eine zunehmende Auflösung, Abflachung und schlechtere Abgrenzbarkeit der Tubuli. Maßstab 50 µm.

Die zeitlichen Entwicklungen der tubulointerstitiellen Veränderungen wurden im Schädigungsscore semiquantitativ erfasst:

Nach einem signifikanten Anstieg des **Gesamtscores** in den ersten 24 Stunden (0 ± 0 an Tag 0 vs. $1,3 \pm 0,06$ an Tag 1; $p < 0,0001$), war die Verschlechterung in den darauffolgenden 2 Tagen nur leicht ausgeprägt ($1,5 \pm 0,004$ an Tag 2 vs. $1,5 \pm 0,01$ an Tag 3; $p > 0,53$; **Abb. 34**). Danach verschlechterte sich der Zustand des Tubulointerstitiums täglich im Vergleich zum jeweiligen Vortag signifikant ($2,1 \pm 0,1$ an Tag 4 vs. $3,0 \pm 0,06$ an Tag 5 vs. $3,4 \pm 0,2$ an Tag 6 vs. $3,7 \pm 0,0$ an Tag 7; $p < 0,042$; **Abb. 34**).

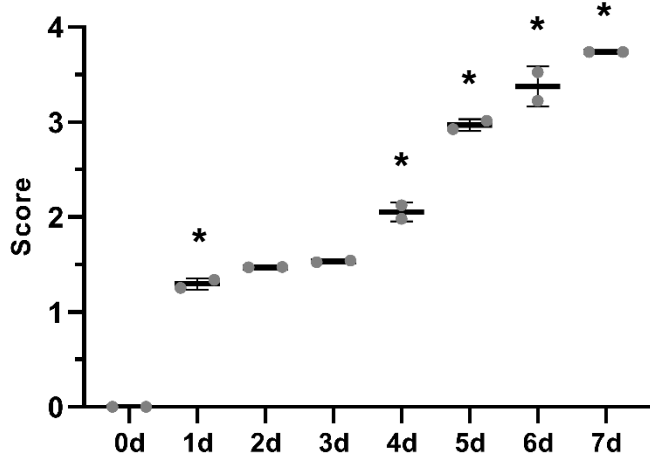


Abb. 34: Gesamtscore der tubulointerstitiellen Schädigung

Im Diagramm sind die ermittelten tubulointerstitiellen Schädigungsscores als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben (n = 38). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

In den Tubuli nahm die **Zellularität** über den Versuchszeitraum hinweg stark ab, wobei die größten, signifikanten Veränderungen in den ersten 24 Stunden und zwischen Tag 4, Tag 5 und Tag 6 zu verzeichnen waren ($0,0 \pm 0,0$ an Tag 0 vs. $1,3 \pm 0,1$ an Tag 1 vs. $1,4 \pm 0,2$ an Tag 2 vs. $1,3 \pm 0,02$ an Tag 3 vs. $1,4 \pm 0,1$ an Tag 4 vs. $2,3 \pm 0,3$ an Tag 5 vs. $3,2 \pm 0,1$ an Tag 6 vs. $3,5 \pm 0,04$ an Tag 7; $p = 0,0002$ im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 1; $p = 0,0013$ zwischen Tag 4 und Tag 5; $p = 0,0014$ zwischen Tag 5 und Tag 6; ansonsten $p > 0,42$; **Abb. 35**). Entsprechend des Scoringwertes waren am Versuchsende mindestens 50 % der Zellkerne entweder atypisch verändert oder vollständig aufgelöst.

Durch die Auflösung von Tubuluszellen füllte sich das Interstitium zunehmend mit **Zell-detritus**. V. a. zwischen Tag 0 und Tag 1 sowie Tag 3 und Tag 4 war die größte und auch signifikante Zunahme zu beobachten ($0,0 \pm 0,0$ an Tag 0 vs. $1,7 \pm 0,2$ an Tag 1 vs. $1,8 \pm 0,1$ an Tag 2 vs. $1,8 \pm 0,1$ an Tag 3 vs. $2,8 \pm 0,05$ an Tag 4 vs. $3,2 \pm 0,5$ an Tag 5 vs. $3,8 \pm 0,01$ an Tag 6 vs. $3,9 \pm 0,1$ an Tag 7; $p = 0,0004$ im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 1; $p = 0,02$ zwischen Tag 3 und Tag 4; ansonsten $p > 0,15$; **Abb. 35**). Insgesamt waren an Tag 7 ungefähr 30 % des Tubulointerstitiums aufgelöst.

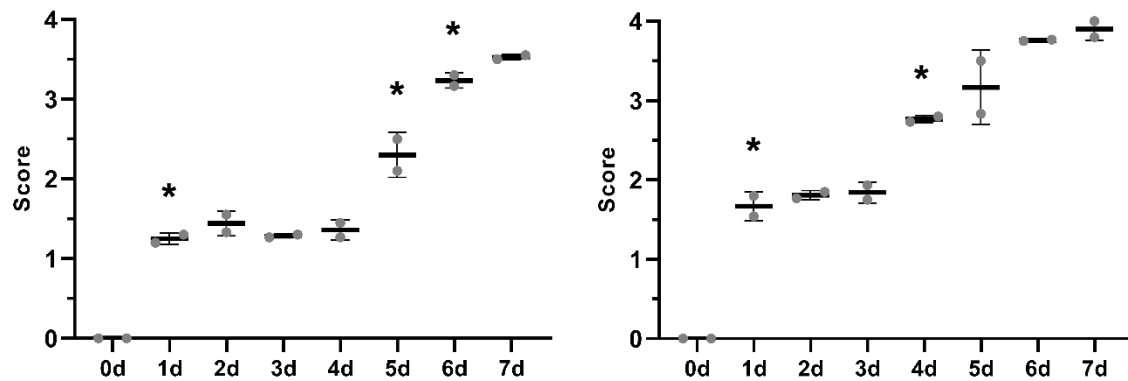


Abb. 35: Tubulointerstitielle Zellularität und Zelldetritus

In den Diagrammen sind die tubulointerstitielle Zellularität (links) und der Anteil an Zelldetritus am Tubulointerstitium (rechts) als Score von 0–4 im Zeitverlauf dargestellt. Die Einzelwerte der Nierenschnitte sind zu pro Versuch gepoolten Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung zusammengefasst ($n = 38$). * steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

Das **Tubuluslumen** war im Versuchsverlauf immer stärker mit eosinophilem Material gefüllt, wobei die Füllung innerhalb der ersten 24 Stunden, zwischen Tag 4 und Tag 5 sowie insgesamt signifikant, ansonsten kontinuierlich zunahm ($0,0 \pm 0,0$ an Tag 0 vs. $1,2 \pm 0,02$ an Tag 1 vs. $1,5 \pm 0,2$ an Tag 2 vs. $1,9 \pm 0,06$ an Tag 3 vs. $2,3 \pm 0,1$ an Tag 4 vs. $3,1 \pm 0,3$ an Tag 5 vs. $3,3 \pm 0,1$ an Tag 6 vs. $3,7 \pm 0,04$ an Tag 7; $p = 0,0004$ im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 1; $p = 0,007$ zwischen Tag 4 und Tag 5; ansonsten $p > 0,14$ im Vergleich zum jeweiligen Vortag; **Abb. 36**).

Es kam zur vermehrten Abflachung des Tubulusepithels und zur schlechteren Abgrenzbarkeit der Zell-Lumen-Grenze. Diese **Tubulusatrophie** nahm kontinuierlich zu und zeigte einen sprunghaften und damit signifikanten Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 5 ($0,0 \pm 0,0$ an Tag 0 vs. $1,1 \pm 0,1$ an Tag 1 vs. $1,2 \pm 0,1$ an Tag 2 vs. $1,1 \pm 0,0$ an Tag 3 vs. $1,8 \pm 0,3$ an Tag 4 vs. $3,4 \pm 0,2$ an Tag 5 vs. $3,2 \pm 0,8$ an Tag 6 vs. $3,9 \pm 0,1$ an Tag 7; $p < 0,0001$ im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 7; $p = 0,01$ zwischen Tag 4 und Tag 5; ansonsten $p > 0,08$ im Vergleich zum jeweiligen Vortag; **Abb. 36**).

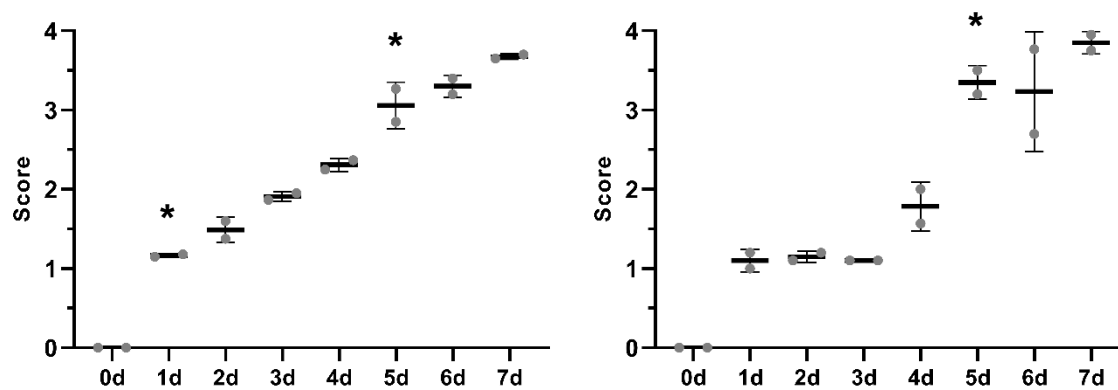


Abb. 36: Füllung des Tubuluslumens und Tubulusatrophie im Zeitverlauf

In den Diagrammen sind die Füllung des Tubuluslumens (links) und Tubulusatrophie (rechts) als Score von 0 – 4 im Zeitverlauf dargestellt. Die Einzelwerte der Nierenschnitte sind zu pro Versuch gepoolten Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung zusammengefasst ($n = 38$). * steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Vortag ($p < 0,05$).

3.6.1 CAM-Übergang im Zeitverlauf

Unabhängig von der Kultivierungszeit konnte an der Verwachsungsstelle zwischen der Mäuseniere und CAM in sämtlichen Präparaten eine Zone erkannt werden, in der das Nierenparenchym keine Zellkerne aufwies bzw. sich in Auflösung befand. Mit längerer Versuchsdauer wurde die Niere immer stärker durch die CAM infiltriert, wobei sich in diesem Bereich auch zunehmende Ansammlungen von Zellkernen im Interstitium vorfanden (**Abb. 38**). Im Übergangsbereich zur CAM konnten einzelne kernhaltige Hühner-Erythrozyten identifiziert werden (**Abb. 39**). Diese Beobachtungen spiegeln sich im steigenden Schädigungsscore wider ($1,4 \pm 0,1$ an Tag 1 vs. $1,7 \pm 0,3$ an Tag 2 vs. $1,9 \pm 0,3$ an Tag 3 vs. $2,3 \pm 0,04$ an Tag 4 vs. $3,0 \pm 0,25$ an Tag 5 vs. $3,4 \pm 0,6$ an Tag 6 vs. $3,6 \pm 0,07$ an Tag 7; **Abb. 37**). Insgesamt kam es zu einer signifikanten Zunahme des Scores ($p = 0,002$ beim Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7), beim Vergleich der Werte zum jeweiligen Vortag wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht ($p > 0,32$). Die Ausdehnung der zellkernfreien Zone nahm von durchschnittlich 14 % der Niere an Tag 1 auf 43 % am Ende des Versuchszeitraums zu ($14,2 \pm 1,1$ % an Tag 1 vs. $18,2 \pm 7,0$ % an Tag 2 vs. $21,7 \pm 1,4$ % an Tag 3 vs. $24,0 \pm 4,3$ % an Tag 4 vs. $33,2 \pm 1,1$ % an Tag 5 vs. $42,4 \pm 14,2$ % an Tag 6 vs. $43,1 \pm 6,5$ % an Tag 7; **Abb. 37**).

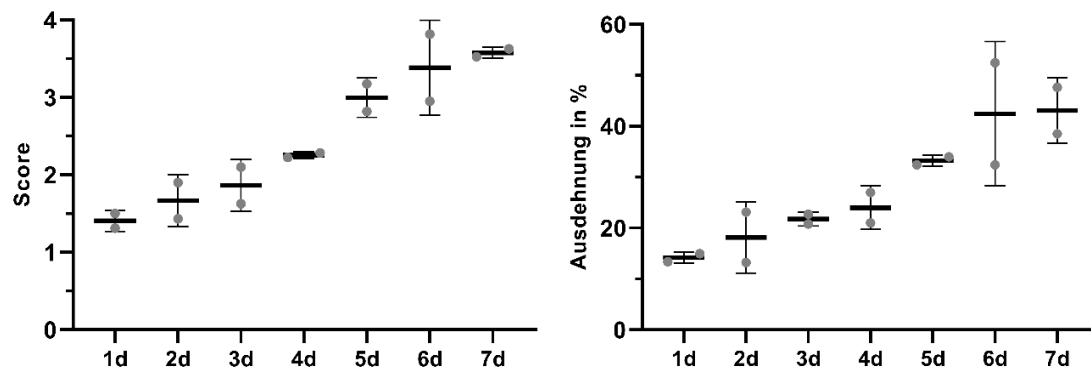


Abb. 37: Schädigung am CAM-Übergang im Zeitverlauf

Das Diagramm zeigt die zunehmende Schädigung am CAM-Übergang im Zeitverlauf als Score von 0-4 (links) und als prozentuale Ausdehnung bezogen auf den Nierendurchmesser. Die Werte sind als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben (n = 38).

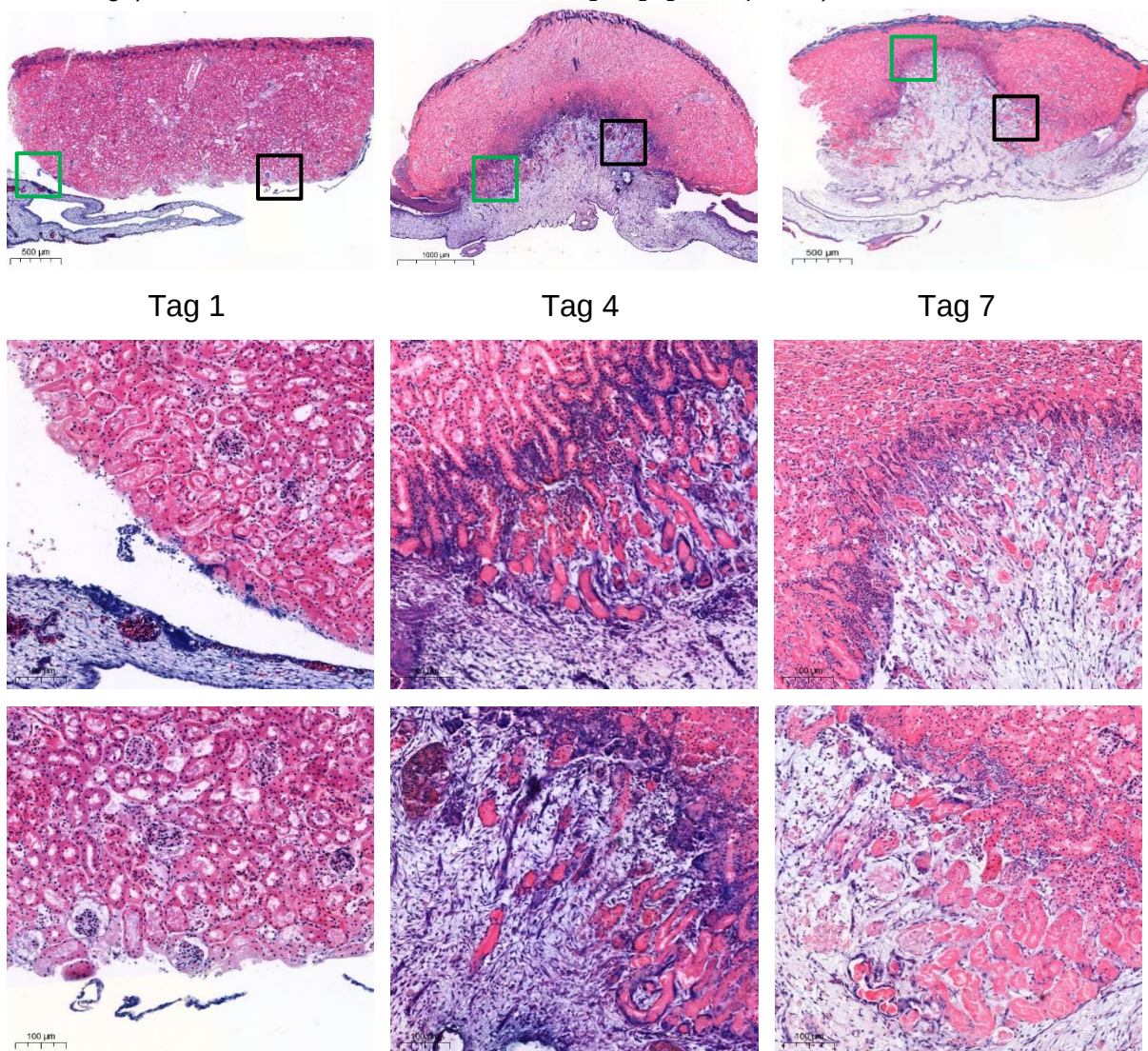


Abb. 38: CAM-Übergang in Nierenschnitten an verschiedenen Zeitpunkten

Unter dem Übersichtsbild in 1,2–2-facher Vergrößerung (oben) sind jeweils zwei Ausschnitte in 10facher Vergrößerung (grün in Mitte und schwarz unten) dargestellt. Die Bilder zeigen nach 1, 4 und 7 Tagen die Zunahme der Schädigung an der Übergangszone zwischen Mäuseniere und CAM. Die Ausdehnung des autolytischen Nierenparenchyms nimmt zu, darüber hinaus ist eine Ansammlung monomorpher Zellkerne zu erkennen. Maßstab 1000 μ m bzw. 500 μ m (oben) und 100 μ m (Bildausschnitte in der Mitte und unten)

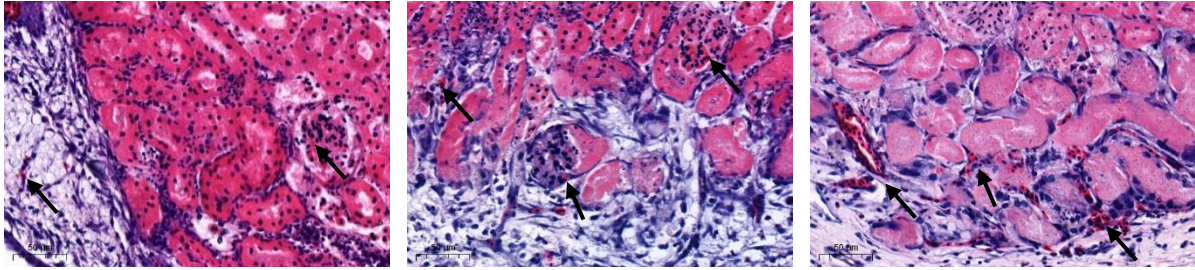


Abb. 39: Hühnererythrozyten am CAM-Übergang

An der Verwachsungszone zwischen Niere und CAM waren in einigen Präparaten Erythrozyten nachweisbar, die teilweise Kerne aufweisen und dem Hühnerembryo zuzuordnen sind (←). Maßstab 50 µm.

3.6.2 Oberflächliche Schädigung im Zeitverlauf

Die Austrocknung des oberflächlichen Nierengewebes nahm über den Kultivierungszeitraum kontinuierlich zu und imponierte durch atrophe Tubuli und Glomeruli (**Abb. 41**). Nach einem Tag waren durchschnittlich ca. 12 % der Ausdehnung der Niere zur Oberfläche hin geschädigt, nach einer Woche ca. 24 % ($11,7 \pm 5,0$ % an Tag 1 vs. $17,2 \pm 4,8$ % an Tag 2 vs. $15,2 \pm 0,2$ % an Tag 3 vs. $18,3 \pm 4,6$ % an Tag 4 vs. $19,2 \pm 0,0$ % an Tag 5 vs. $20,5 \pm 0,8$ % an Tag 6 vs. $23,7 \pm 1,7$ % an Tag 7; **Abb. 40**). Dementsprechend stieg der Schädigungsscore insgesamt signifikant ($1,3 \pm 0,3$ an Tag 1 vs. $1,6 \pm 0,2$ an Tag 2 vs. $2,0 \pm 0,07$ an Tag 3 vs. $2,3 \pm 0,3$ an Tag 4 vs. $2,7 \pm 0,05$ an Tag 5 vs. $2,8 \pm 0,07$ an Tag 6 vs. $3,4 \pm 0,05$ an Tag 7; $p = 0,0001$ beim Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7; **Abb. 40**).

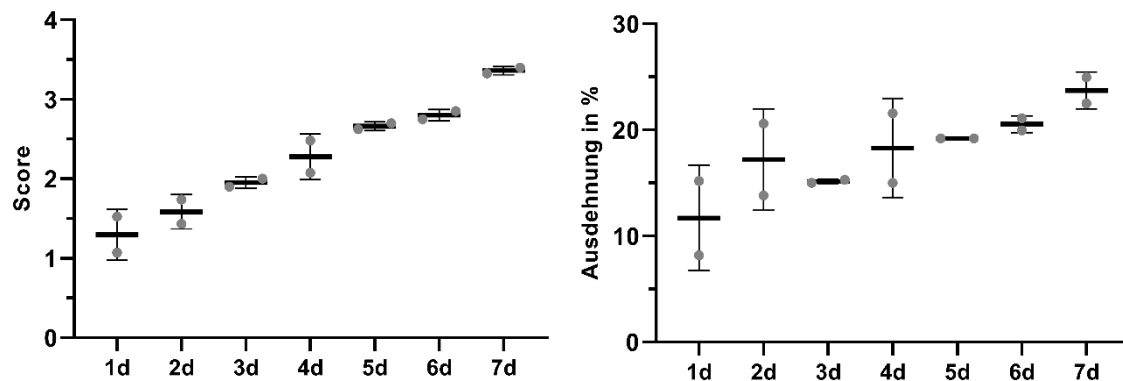
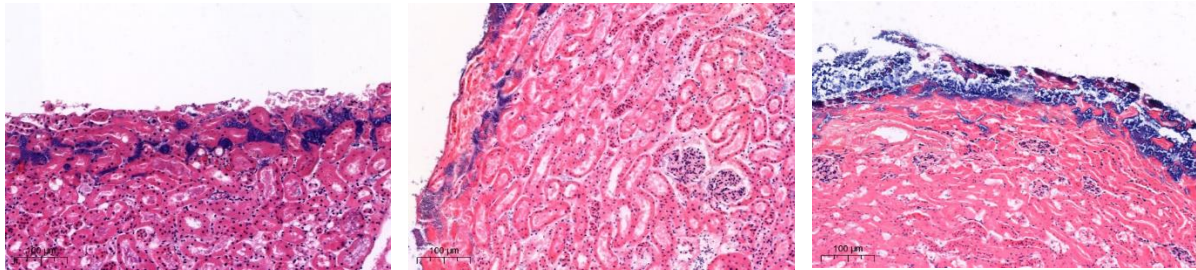


Abb. 40: Schädigung der Oberfläche im Zeitverlauf

Das Diagramm zeigt die zunehmende Schädigung der oberflächlichen Zone der Niere im Zeitverlauf als Score von 0 – 4 (links) und als prozentuale Ausdehnung bezogen auf den Nierendurchmesser. Die Werte sind als pro Versuch gepoolte Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben ($n = 38$).



Tag 1

Tag 4

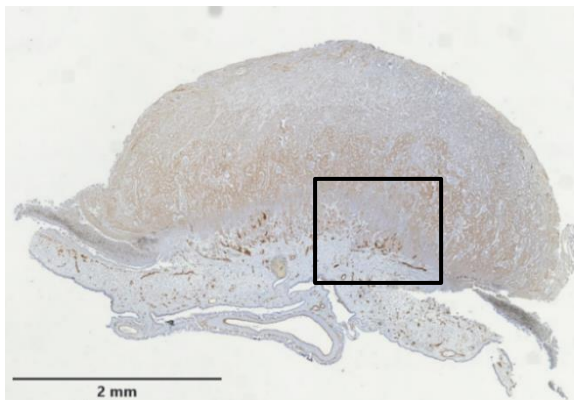
Tag 7

Abb. 41: Oberflächliche Schädigung der Nierenschnitte im Zeitverlauf

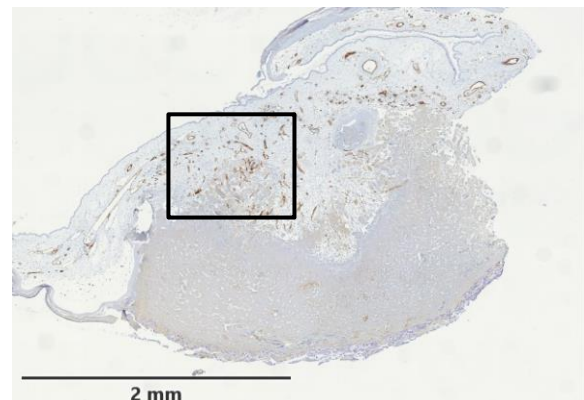
Die HE-Bilder zeigen eine Zunahme des geschädigten, oberflächlichen Bereichs der Mäuseniere im Verlauf der Woche (1, 4 und 7 Tage; 10fache Vergrößerung). Maßstab 100 µm.

3.6.3 Immunhistochemische Färbungen (CD31 und PCNA)

Insgesamt konnten ab einer Kultivierungszeit von 4 Tagen CD31-positive Zellen beobachtet werden, wobei die Dichte an gefärbten Zellen im Zeitverlauf über eine Woche zunahm. Insbesondere an der Übergangszone zwischen CAM und Mäuseniere zwischen den Tubuli konnten die markierten Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 42**).



Tag 4



Tag 7

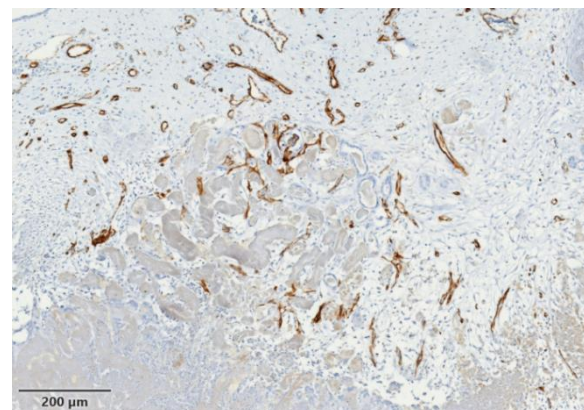
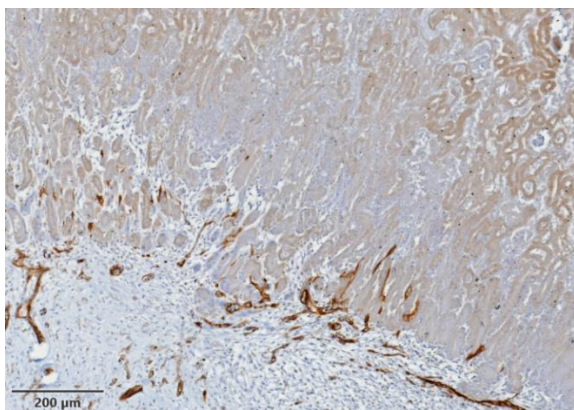
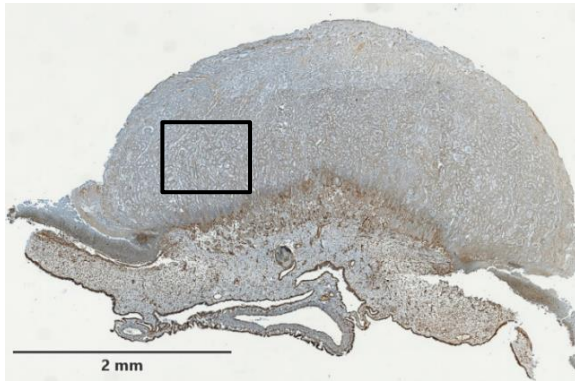


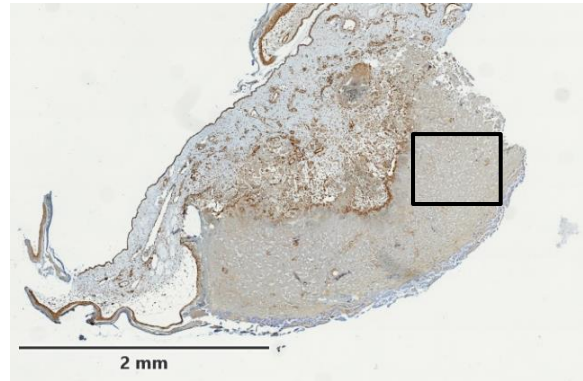
Abb. 42: CD31-gefärbte Zellen im Zeitverlauf

Im Vergleich der immunhistochemischen Schnitten ist sichtbar, dass die Dichte an braun gefärbten Arealen im Sinne CD31-positiven Zellen im Vergleich zwischen einer Kultivierungszeit von 4 und 7 Tagen zunimmt. Maßstab 2 mm (oben) und 200 µm (unten).

PCNA-positive Zellen in den Glomeruli und insbesondere im Tubulusepithel fanden sich v.a. nach 3–5 Tagen Kultivierung, während zu einem früheren Zeitpunkt sowie nach 6 bzw. 7 Tagen kaum proliferierende Zellkerne in der Mäuseniere detektiert werden konnten. Besonders viele PCNA-positive Zellen fanden sich dabei auf der CAM-nahen Seite der Niere, weniger zur Oberfläche hin (**Abb. 43**).



Tag 4



Tag 7

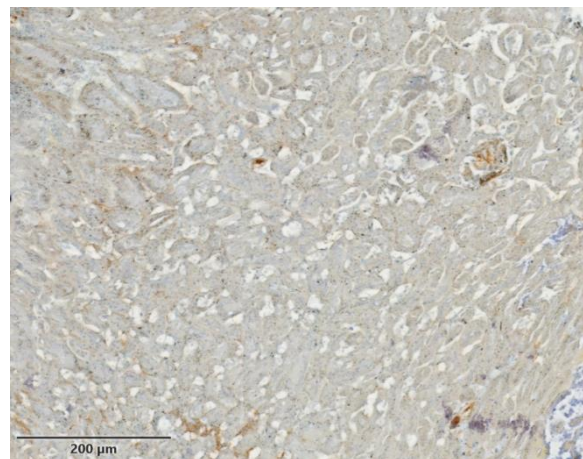
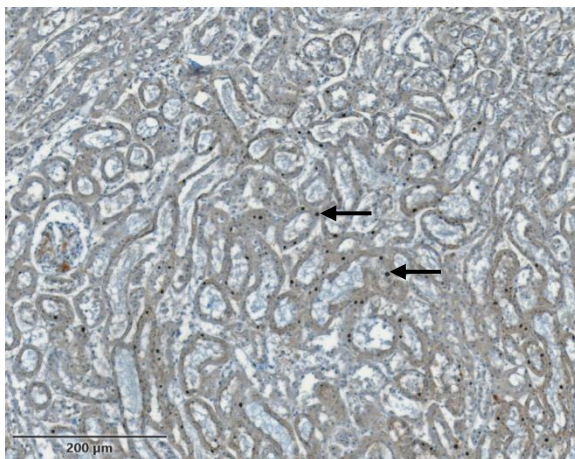


Abb. 43: PCNA-positive Zellen im Zeitverlauf

Im Vergleich der immunhistochemischen Schnitten mit einem Anti-PCNA-Antikörper zeigt sich, dass nach 4 Tagen insbesondere Zellkerne tubulärer Zellen und einiger Zellen des glomerulären Epithels PCNA-positiv gefärbt sind (←), während im weiteren Zeitverlauf nach 7 Tagen keine proliferierenden Zellen nachgewiesen werden können. Maßstab 2 mm (oben) und 200 µm (unten).

3.6.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die ultrastrukturelle Analyse der Nierenschnitte unter dem Transmissionselektronenmikroskop zeigte über den Zeitverlauf einer Woche diverse Veränderungen in der Architektur der Nierenstrukturen, die über die Beobachtungen im HE-Bild hinausgehen (**Abb. 44** und **45**).

Im Vergleich zum Primärmaterial, das intakte Zellen mit erhaltenem Zytosol und euchromatinreichen Zellkernen aufwies, waren bereits nach 1 bzw. 2 Tagen in den Zellen Vakuolen nachweisbar. Insgesamt befand sich bereits zu diesem Zeitpunkt das Zytosol in Auflösung, erkennbar waren v. a. noch die Zellkerne, die bereits verdichtet waren als Zeichen des beginnenden Untergangs. Es waren Reste des fenestrierten Endothels zu sehen, während im Vergleich dazu die Podozytenzellkerne besser erhalten waren. Die Podozytenfußfortsätze mit der verbindenden Schlitzmembran waren ebenfalls teilweise erhalten.

Nach 3 bzw. 4 Tagen erschien die Bowman-Kapsel um die Glomeruli verdickt, zudem waren mehr Zellkerne pyknotisch und befanden sich in Auflösung. Nach 5 Tagen zeigte sich neben der zunehmenden Auflösung der Zellstrukturen eine Verdickung der Basalmembran um die Kapillarschlingen. Nach 6 bzw. 7 Tagen waren zusätzlich peripher um die Bowman-Kapsel Kollagenfibrillen nachweisbar. Die Fußfortsätze der Podozyten waren auch zum Zeitpunkt des Versuchsendes noch teilweise erkennbar.

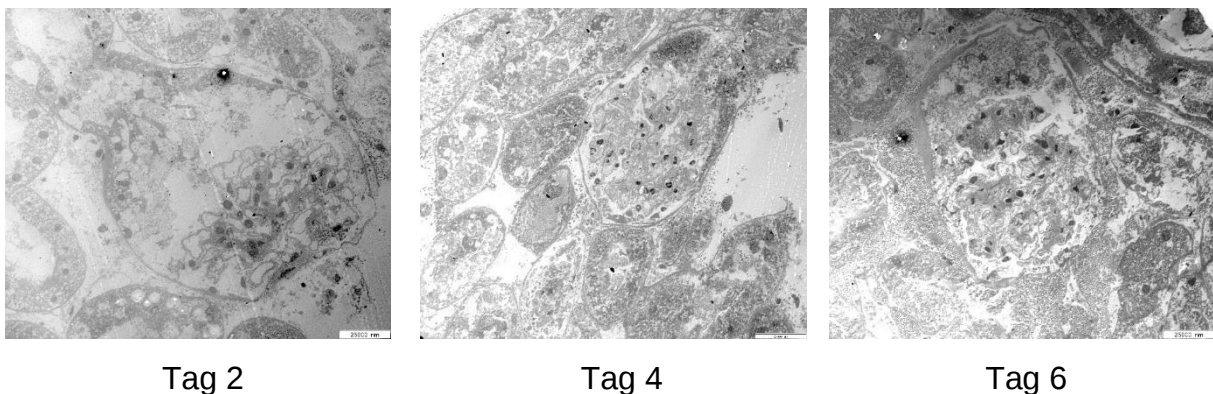
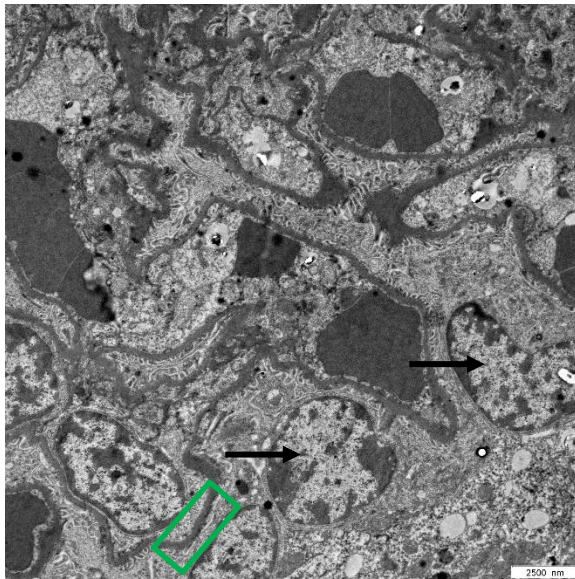
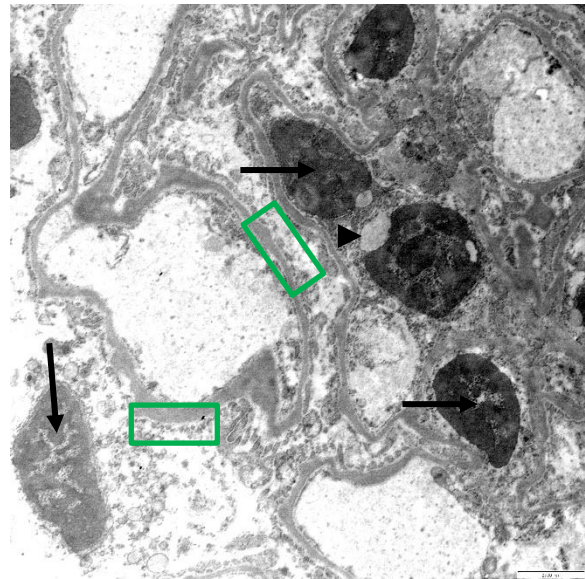


Abb. 44: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen im Zeitverlauf

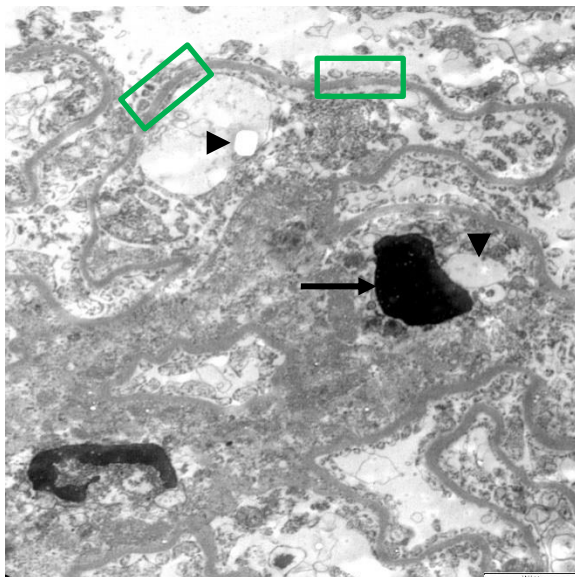
In den EM-Bildern in 400facher Vergrößerung ist eine zunehmende Auflösung der Zellstrukturen nach 2, 4 und 6 Tagen Kultivierung zu erkennen. In den Tubuli sind nach 4 bzw. 6 Tagen kaum mehr Zellkerne abgrenzbar, das Zytosol erscheint zerfallen. In den Glomeruli ist eine Verdichtung der Zellkerne und eine Verdickung der umgebenden Bowman-Kapsel erkennbar. Maßstab 25000nm.



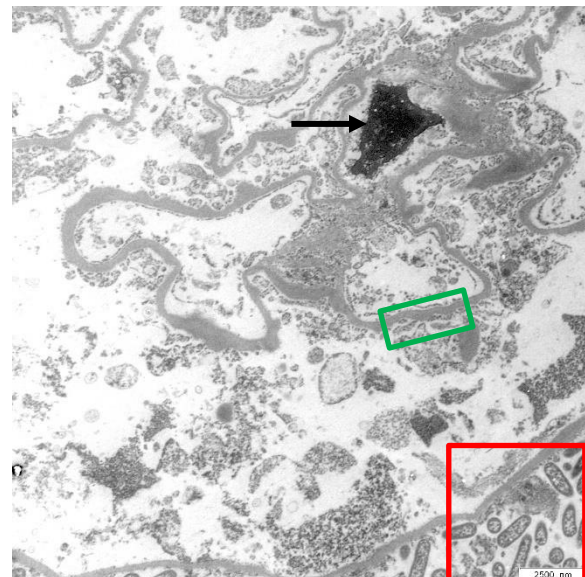
Primärmaterial



Tag 2



Tag 4



Tag 6

Abb. 45: Elektronenmikroskopische Aufnahmen im Zeitverlauf im Vergleich zum Primärmaterial

In den EM-Bildern 4400facher Vergrößerung ist erkennbar, dass im Vergleich zum Primärmaterial die glomerulären Strukturen im Verlauf deutlich heller, aufgelockert und weniger kompakt erscheinen. Das Zytosol befindet sich zunehmend in Auflösung, es sind vermehrt Vakuolen zu erkennen (►). Während die Zellkerne (—>) im Primärmaterial zahlreich vorhanden und euchromatinreich sind, sind sie im Verlauf nur noch vereinzelt erkennbar und in ihrem Aussehen verdichtet und verkleinert. Die Basalmembran wirkt auch nach 6 Tagen noch intakt, jedoch verdickt, wie auch die Bowman-Kapsel, um die nach 6 Tagen Kollagenfibrillen (rot) nachweisbar sind. Die Podozytenfußfortsätze (grün) sind auch nach 6 Tagen noch teilweise erkennbar. Maßstab 2500 nm (unten).

3.7 Vergleich der Abdeckungen über 5 und 7 Tage

Mit den Abdeckungen aus den Versuchsreihen mit einem Zeitraum von einer Woche mit den besten Scores (Vlies, Cellophan, Schwamm) wurden zum Vergleich des Erhalts ihrer Vitalität weitere Nierenschnitte für 5 Tage kultiviert (**Abb. 46**). Bei der Bedeckung mit Cellophan wurde zwischen einer Handhabung ohne Wechsel und mit täglichem Wechsel der Folie unterschieden.

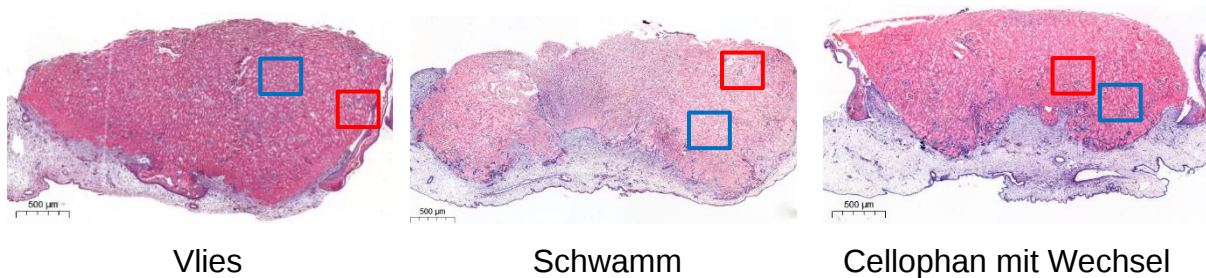


Abb. 46: Exemplarische Nierenschnitte nach 5 Tagen in der Übersicht

Die HE-Bilder vermitteln einen Überblick (in 1,9–2facher Vergrößerung) über 5 Tage lang kultivierte Nierenschnitte mit Vlies, Schwamm und Cellophan. In den **Abb. 48** und **50** werden die glomerulären (rot) und tubulointerstitiellen (blau) Ausschnitte vergrößert dargestellt. Maßstab 500 µm.

3.7.1 Glomeruläre Schädigung nach 5 und 7 Tagen

Nach einer Dauer von 5 Tagen unterschieden sich die Abdeckungen nicht signifikant voneinander bzw. von der Kultivierung ohne Abdeckung (ohne Abdeckung: $1,8 \pm 0,2$; Vlies: $1,5 \pm 0,3$; Cellophan mit Wechsel: $1,7 \pm 0,1$; Cellophan ohne Wechsel: $1,4 \pm 0,1$; Schwamm: $1,3 \pm 0,2$; $p > 0,17$; **Abb. 47**). Einzelne Schnitte wiesen als Ausdruck einer geringen glomerulären Schädigung Scoringwerte von minimal 1,2 mit Schwamm bzw. 1,23 mit Vlies und Cellophan ohne Wechsel auf.

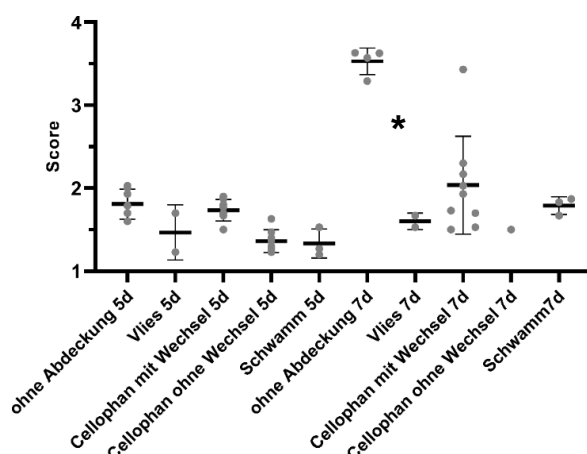


Abb. 47: Glomerulärer Schädigungsscore für verschiedene Abdeckungen

Im Diagramm sind die Gesamtscores zur glomerulären Beurteilung nach 5 bzw. 7 Tagen je Abdeckung als Mittelwert der 47 Einzelwerte ± Standardabweichung angegeben (ohne Abdeckung 5d: $n = 7$ und 7d: $n = 4$; Vlies 5d: $n = 2$ und 7d: $n = 2$; Cellophan mit Wechsel 5d: $n = 8$ und 7d: $n = 9$; Cellophan ohne Wechsel 5d: $n = 8$ und 7d: $n = 1$; Schwamm 5d: $n = 3$ und 7d: $n = 3$). * steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen 5 und 7 Tagen für die jeweilige Abdeckung ($p < 0,05$).

Beim Vergleich zwischen dem 5- und 7-tägigem Versuchszeitraum auf der CAM kam es ohne Abdeckung zu einer starken, signifikanten Verschlechterung des glomerulären Schädigungsmaßes ($p < 0,0001$), jedoch nicht beim Vlies ($p > 0,99$), Cellophan mit Wechsel ($p = 0,60$) und ohne Wechsel ($p > 0,99$) sowie Schwamm ($p = 0,72$). Dort konnte lediglich eine leichte Zunahme an Zellkernveränderungen im Glomerulus und Füllung des Kapselraumes erkannt werden (**Abb. 48**). Beim Cellophan brachte das Handling ohne täglichen Wechsel der Folie sowohl nach 5 als auch nach 7 Tagen keine wesentliche Verbesserung des glomerulären Zustandes (**Abb. 47**).

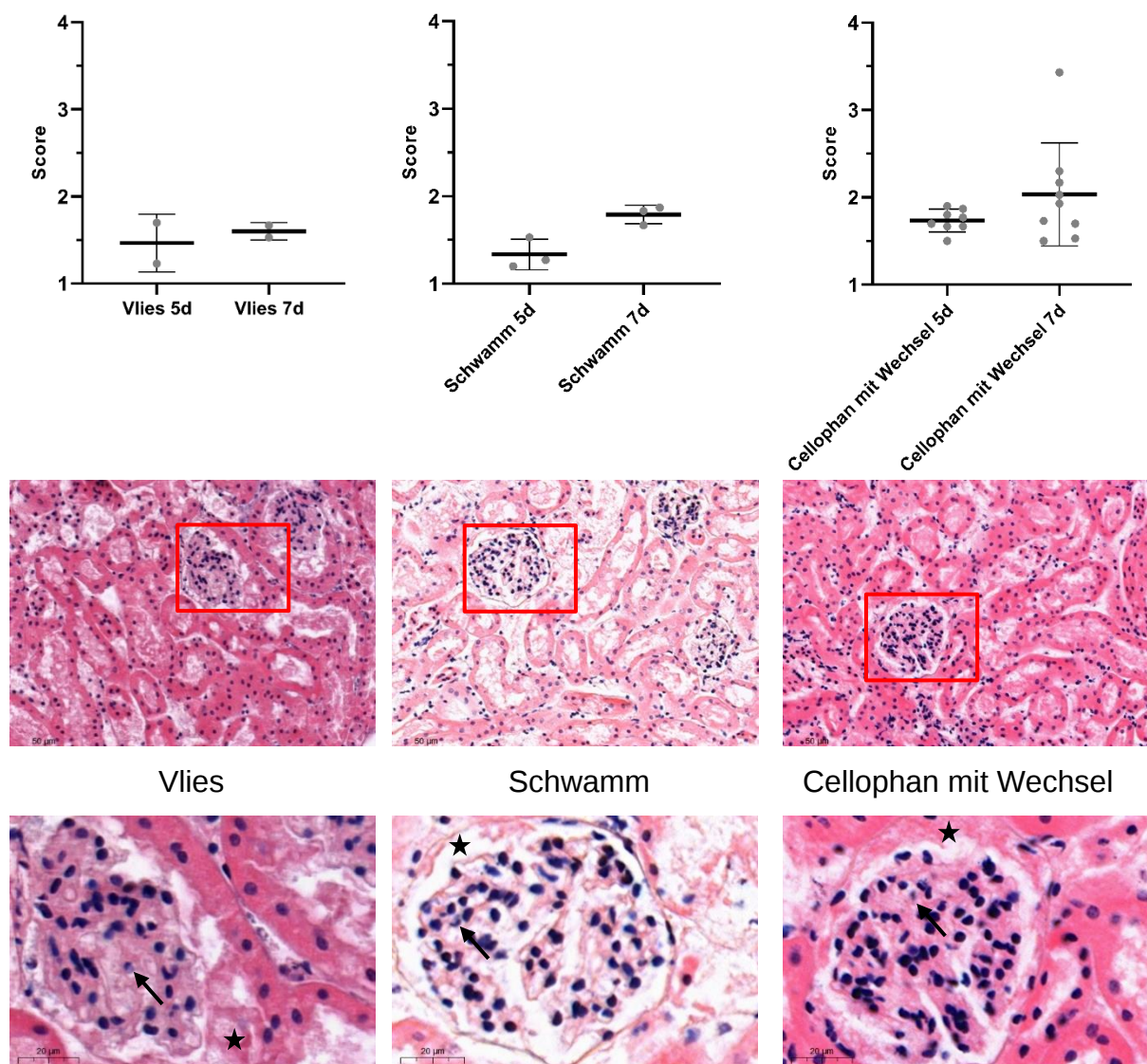


Abb. 48: Glomeruläre Schädigung nach 5 Tagen

In den Diagrammen ist die glomeruläre Schädigung nach 5 Tagen im Vergleich zu 7 Tagen für Vlies, Schwamm und Cellophan mit Wechsel als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die HE-Bilder zeigen Ausschnitte der Übersichtsbilder in **Abb. 46** in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) mit Vlies, Schwamm und Cellophan mit Wechsel. Die Glomeruli erscheinen gut erhalten mit gering reduzierter Zellularität, wenigen atypischen Zellkernen ($\longrightarrow$) und einer geringen Füllung des Kapselraumes ($\star$), verglichen mit den 7 Tage lang kultivierten Schnitten (s. **Abb. 20**). Maßstab 50 μ m (oben) bzw. 20 μ m (unten).

3.7.2 Tubulointerstitielle Schädigung nach 5 und 7 Tagen

Nach 5 Tagen unterschieden sich die verschiedenen Abdeckungen in ihrer tubulointerstitiellen Schädigung nicht signifikant untereinander und von der Kultivierung ohne Abdeckung (ohne Abdeckung: $2,8 \pm 0,3$; Vlies: $2,2 \pm 0,0$; Cellophan mit Wechsel: $2,4 \pm 0,2$; Cellophan ohne Wechsel: $2,5 \pm 0,3$; Schwamm: $2,9 \pm 0,1$; $p > 0,11$; **Abb. 49**). Die Schnitte mit dem geringsten Score als Ausdruck eines guten tubulointerstitiellen Erhalts waren Cellophan ohne täglichen Wechsel mit 2,03, Vlies mit 2,15 sowie Cellophan mit Wechsel mit 2,17.

Beim Vergleich zwischen dem 5- und 7-tägigem Versuchszeitraum auf der CAM kam es ohne Abdeckung ($p = 0,0002$) sowie mit täglich gewechseltem Cellophan ($p = 0,03$) zu einer starken, signifikanten Verschlechterung des tubulointerstitiellen Schädigungsmaßes, beim Vlies ($p > 0,99$), Cellophan ohne Wechsel ($p = 0,99$) sowie Schwamm ($p = 0,62$; **Abb. 50**) blieb der tubulointerstitielle Zustand relativ stabil.

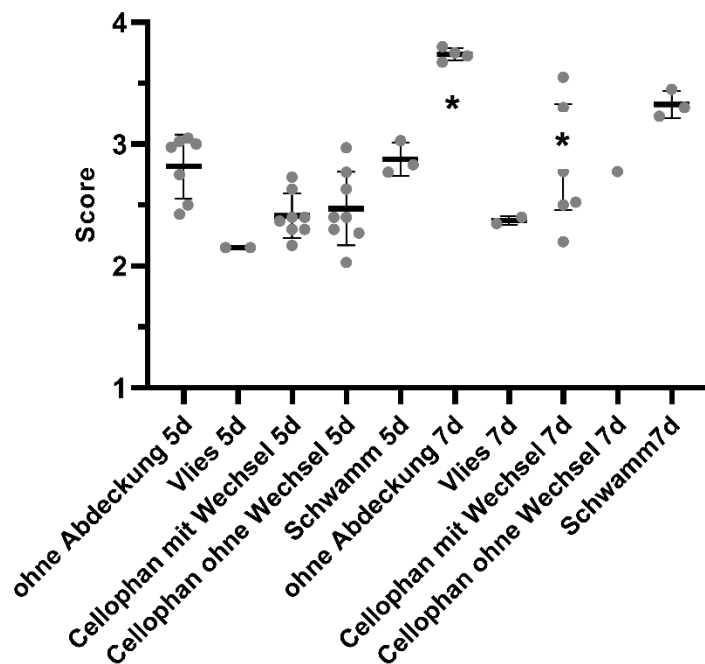


Abb. 49: Tubulointerstitieller Schädigungsscore für verschiedene Abdeckungen

Im Diagramm sind die Gesamtscores zur Bewertung der tubulointerstitiellen Schädigung nach 5 bzw. 7 Tagen je Abdeckung als Mittelwerte der Einzelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben ($n = 47$). * steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zwischen 5 und 7 Tagen für die jeweilige Abdeckung ($p < 0,05$).

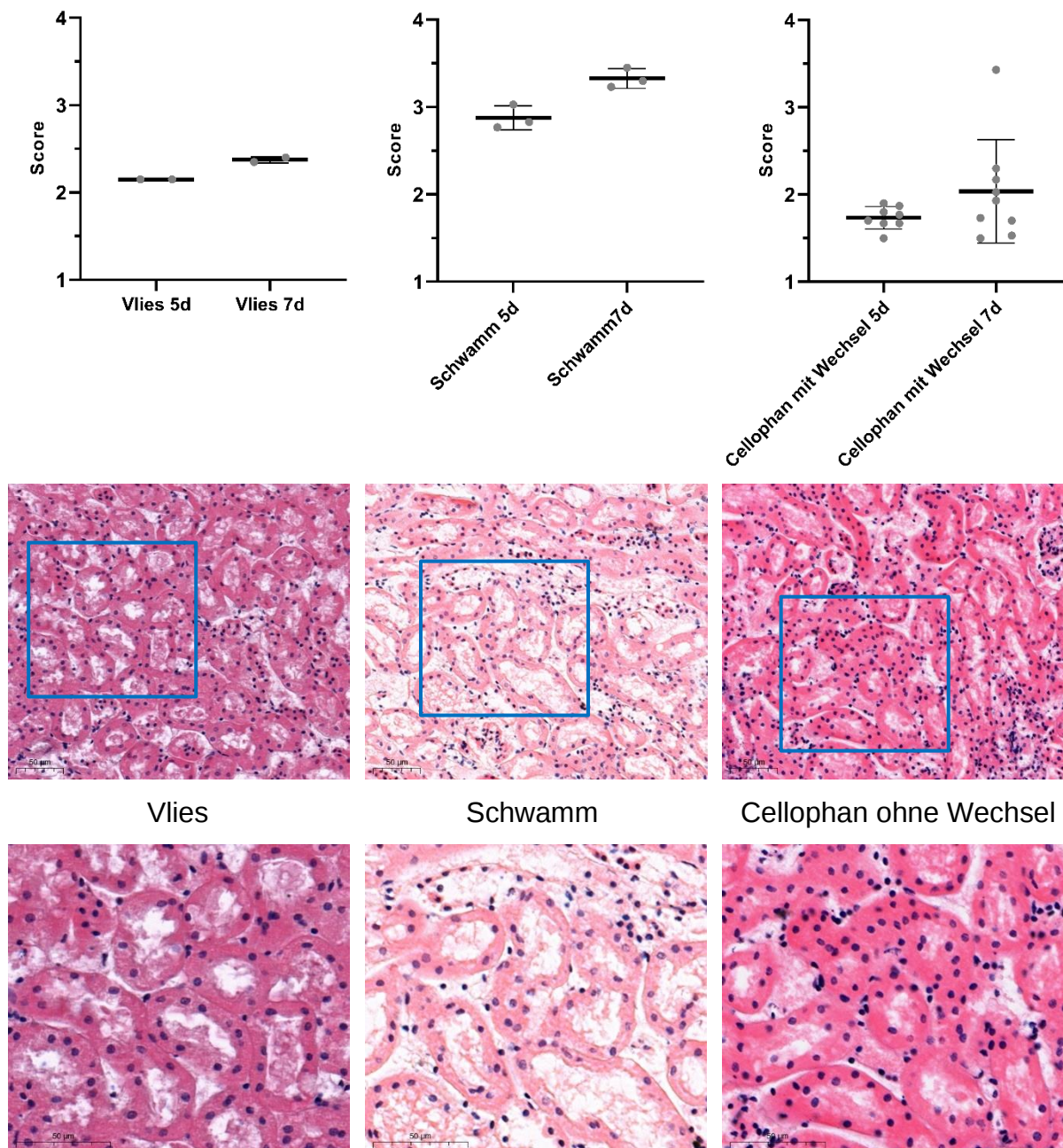


Abb. 50: Tubulointerstitielle Schädigung nach 5 Tagen

Im Diagramm sind die Werte des tubulointerstitiellen Schädigungsscores für Vlies, Schwamm und Cellophan ohne Wechsel nach 5 und 7 Tage gegenübergestellt, dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n = 47$). In den HE-Bilder sind die tubulointerstitiellen Ausschnitte aus den Übersichtsbildern in **Abb. 46** in 20- und 40facher Vergrößerung dargestellt. Man erkennt einen guten Erhalt der Tubuli verglichen mit den Nierenschnitten nach 7 Tagen Kultivierung (s. **Abb. 22**). Die Veränderungen an den Zellkernen, dem Epithel und Tubuluslumen sind geringer ausgeprägt. Maßstab 50 μm .

3.7.3 CAM-Übergang nach 5 und 7 Tagen

Alle HE-Präparate wiesen an der Verwachsungsstelle zwischen der Mäuseniere und CAM eine Zone auf, in der sich das Nierenparenchym auflöste und keine Zellkerne mehr aufwies (**Abb. 52**). Der Vergleich der verschiedenen 5 Tage lang kultivierten Nierenschnitte zeigte keine signifikanten Unterschiede (ohne Abdeckung: $2,6 \pm 0,8$; Vlies: $1,5 \pm 0,1$; Cellophan mit Wechsel: $2,6 \pm 0,7$; Cellophan ohne Wechsel: $2,4 \pm 0,4$; Schwamm: $3,3 \pm 0,5$; $p > 0,53$: **Abb. 51**).

Nach 7 Tagen kam es verglichen mit 5 Tagen unter allen Abdeckungen zu einer nicht-signifikanten Zunahme der zellkernfreien Zone ($p > 0,25$).

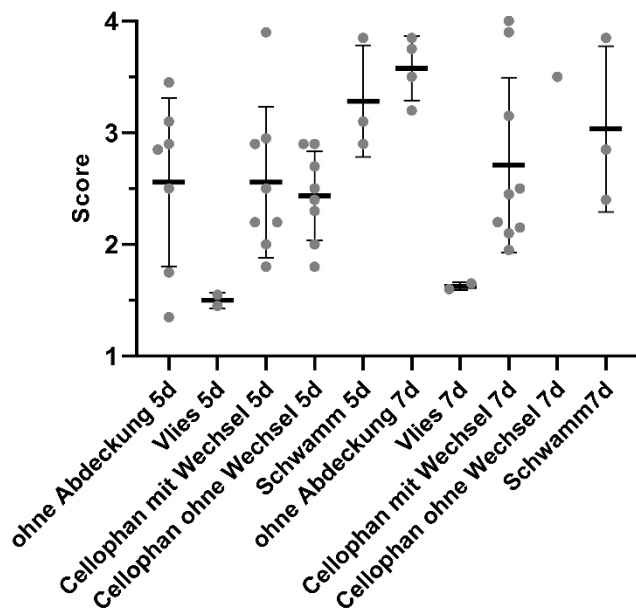


Abb. 51: Schädigungsscore CAM-Übergang für verschiedene Abdeckungen

Dargestellt sind die Scoringwerte zur Einschätzung des Schädigungsmaßes am CAM-Übergang als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($n = 47$).

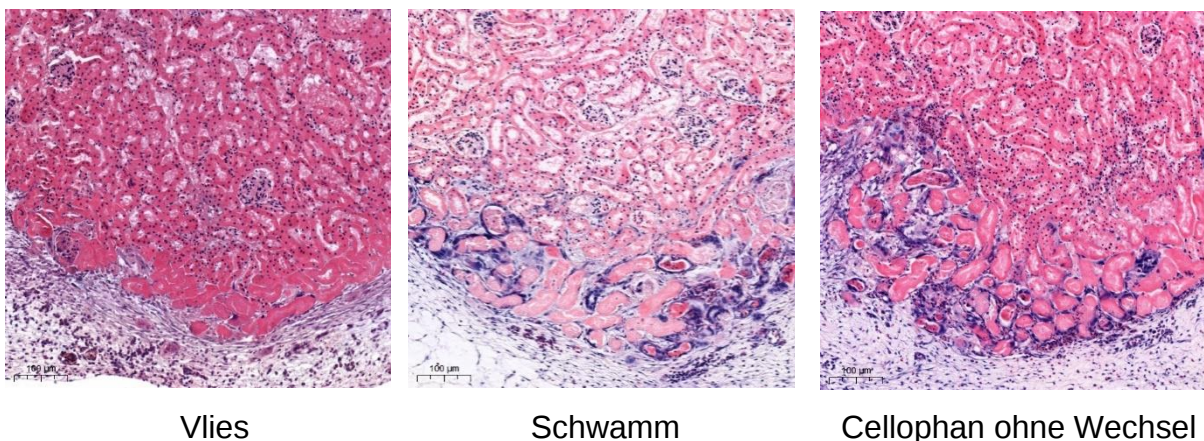


Abb. 52: CAM-Übergang nach 5 Tagen

In den HE-Bildern ist die zellkernfreie Zone am CAM-Übergang nach 5-tägiger Kultivierung in den Präparaten mit Vlies, Schwamm und Cellophan gut zu sehen. Verglichen mit einer Versuchsdauer von 7 Tagen ist die Ausprägung aber geringer. Maßstab 100 µm.

3.7.4 Oberflächliche Schädigung nach 5 und 7 Tagen

Im Ausmaß der oberflächlichen Schädigung unterschieden sich die Präparate nach 5 Tagen Versuchszeitraum nicht signifikant (ohne Abdeckung: $2,6 \pm 0,1$; Vlies: $2,0 \pm 0,1$; Cellophan mit Wechsel: $2,4 \pm 0,4$; Cellophan ohne Wechsel: $2,2 \pm 0,2$; Schwamm: $2,9 \pm 0,2$; $p > 0,81$; **Abb. 53** und **54**). Im Vergleich zwischen der 5- und 7-tägigen Kultivierungsdauer trat in allen Versuchsgruppen eine geringe, jedoch nicht-signifikante Verschlechterung auf, ohne Abdeckung war die Zunahme der oberflächlichen Schädigung etwas stärker ausgeprägt (ohne Abdeckung: $p = 0,31$; ansonsten $p > 0,99$; **Abb. 53**).

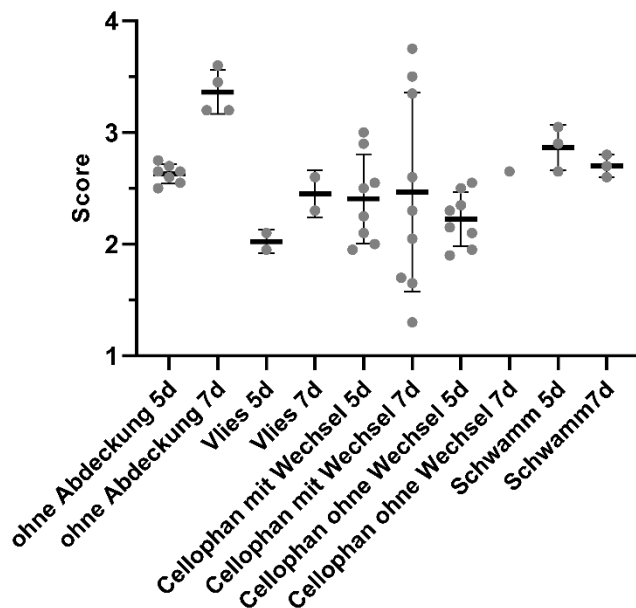


Abb. 53: Schädigung der Oberfläche für verschiedene Abdeckungen

Dargestellt ist der Schädigungsscore als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n = 47$) für das Ausmaß der Schädigung an der Oberfläche der Niere nach 5-tägiger Kultivierung mit verschiedenen Abdeckungen.

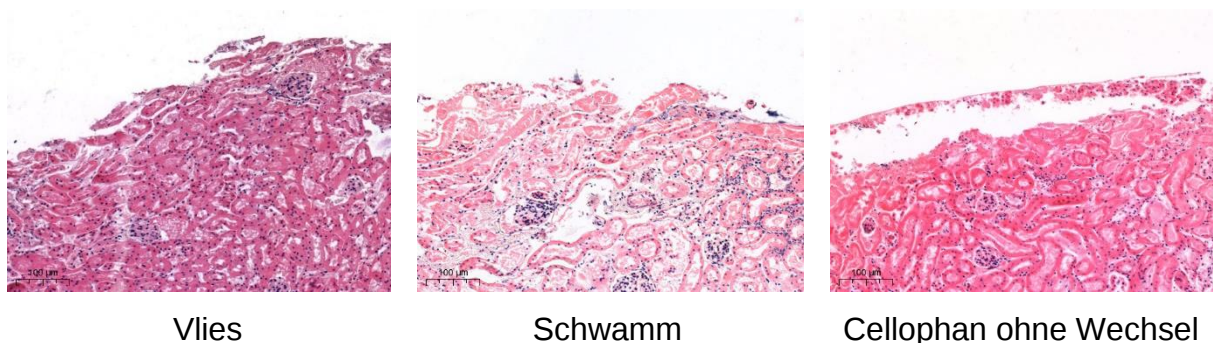


Abb. 54: Schädigungsausmaß an der Oberfläche nach 5 Tagen

In den HE-gefärbten Präparaten ist exemplarisch das Schädigungsausmaß an der Oberfläche der Niere nach 5 Tage Kultivierung mit Vlies, Schwamm und Cellophan ohne Wechsel dargestellt. Es zeigt sich eine geringere Ausdehnung atrophen Nierenparenchyms verglichen mit 7 Tage lang kultivierten Schnitten. Maßstab 100 μ m.

3.8 Optimierung der Versuchsbedingungen

3.8.1 Wahl des Mediums

Ein Vergleich der 3 eingesetzten Medien zeigt, dass RPMI zu einer signifikant weniger ausgeprägten glomerulären Schädigung führte als DMEM High Glucose mit Zusätzen, zwischen RPMI und DMEM High Glucose bestand kein Unterschied (RPMI: $2,0 \pm 0,6$; DMEM: $2,5 \pm 0,7$; DMEM High Glucose mit Zusätzen: $3,3 \pm 0,2$; $p = 0,39$ RPMI vs. DMEM; $p = 0,005$ RPMI vs. DMEM High Glucose mit Zusätzen; $n = 17$). Das Tubulointerstitium blieb mit RPMI signifikant besser erhalten als mit den beiden anderen Medien (RPMI: $2,9 \pm 0,4$; DMEM: $3,8 \pm 0,2$; DMEM High Glucose mit Zusätzen: $3,8 \pm 0,1$; $p = 0,002$). Sowohl im Ausmaß der Schädigungszone zur CAM als auch zur Oberfläche waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (CAM-Übergang: RPMI: $2,7 \pm 0,8$; DMEM: $2,4 \pm 0,6$; DMEM High Glucose mit Zusätzen: $3,1 \pm 0,9$; $p > 0,46$; Oberfläche: RPMI: $2,5 \pm 0,9$; DMEM: $3,0 \pm 0,5$; DMEM High Glucose mit Zusätzen: $3,1 \pm 0,3$; $p > 0,39$).

3.8.2 Kultivierung mit Silikonring

Es wurden Nierenschnitte ohne Abdeckung, mit Frischhaltefolie und Matrigel mit einem Ring kultiviert, mit dem Ziel, die Immobilisation und kontinuierliche Nährstoffversorgung der Niere durch das Behandlungsmedium zu verbessern. Im Ausmaß der Schädigung sowohl glomerulär, an der Verwachsungszone zwischen Niere und CAM als auch oberflächlich konnte keine signifikante Verbesserung zur standardmäßigen Kultivierung ohne Ring festgestellt werden (Glomerulär: ohne Abdeckung mit Ring: $3,7 \pm 0,1$; Frischhaltefolie mit Ring: $2,3 \pm 0,4$; Matrigel mit Ring: $2,9 \pm 0,3$; $p > 0,56$; CAM-Übergang: ohne Abdeckung mit Ring: $3,9 \pm 0,1$; Frischhaltefolie mit Ring: $3,8 \pm 0,3$; Matrigel mit Ring: $2,9 \pm 0,2$; $p > 0,47$; Oberfläche: ohne Abdeckung mit Ring: $3,1 \pm 0,5$; Frischhaltefolie mit Ring: $2,8 \pm 0,3$; Matrigel mit Ring: $2,6 \pm 0,3$; $p > 0,33$). Bezogen auf das Tubulointerstitium war lediglich mit Matrigel und Ring eine Verbesserung zu erkennen (Tubulointerstitium: ohne Abdeckung mit Ring: $3,7 \pm 0,1$; Frischhaltefolie mit Ring: $3,4 \pm 0,1$; Matrigel mit Ring: $3,1 \pm 0,1$; $p < 0,0001$ mit Matrigel und Ring; ansonsten $p > 0,18$; keine Abbildung).

4 Diskussion

Die Möglichkeiten, in der Nierenforschung die Lücke zwischen der *in-vitro*-Zellkultur und dem *in-vivo*-Tierversuch zu schließen, sind bisher zeitlich auf wenige Stunden limitiert und eher bei embryonalem Gewebe erfolgsversprechend. Insbesondere sind Methoden zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen an kultivierten Nieren außerhalb des Organismus rar (19). Adultes Nierengewebe ist schwer am Leben zu halten, da es empfindlich gegenüber Hypoxie ist und durch Diffusion nur unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden kann (23).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass das CAM-Modell als *ex-vivo*-Modell eine mögliche Alternative darstellt und ein erfolgreiches Anwachsen von murinem Nierengewebe verspricht (8). Anders als bei der „precision-cut-kidney-slices“-Kultur (PCKS), bei der Nierenschnitte in einem physiologischen Puffer oder Nährmedium kultiviert werden, imitiert die Kultivierung auf der CAM die natürlichen Wachstumsbedingungen im Organismus besser und ermöglicht auf diese Weise, Nierenschnitte über den Zeitraum von bis zu 7 Tagen zumindest teilweise vital zu halten (8, 18, 30). Die Kultivierung auf der CAM könnte in nierenbezogenen Forschungsfeldern angewandt werden, wobei zu betonen ist, dass diese Kultivierungsmethode die ethischen 3R-Prinzipien (reduce, replace, refine) erfüllt (46, 47). Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Forschung zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) und hat bereits erfolgreich Nierenzysten von betroffenen Patienten im CAM-Modell kultiviert. Neben der genaueren Erforschung zu den Pathomechanismen und Hintergründen der Krankheit dient die Kultivierung auf der CAM auch der Testung potenzieller Therapeutika direkt an Patientengewebe, um davon patientenindividuelle Behandlungsmöglichkeiten ableiten zu können (8).

Während das Überleben humaner Nierenzysten auf der CAM problemlos möglich ist, gestaltet sich die Kultivierung reifer, adulter Mäusenieren auf der CAM deutlich aufwendiger und schwieriger. Grundsätzlich ist jedoch eine Kultivierung möglich, bisher scheint ein Vlies als Bedeckung des Nierenschnittes wichtig und notwendig, um ein Anwachsen des Gewebes an der CAM zu ermöglichen. Darunter ergaben sich Hinweise auf eine zumindest teilweise erhaltene Vitalität, besonders der proximalen Tubuli und Sammelrohre, während v. a. der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife und distale Tubulus als hypoxieempfindlichere Nephronteile größere Schäden zeigten (8).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Verbesserung des etablierten Protokolls nach einer Optimierung der Versuchsbedingungen zur Kultivierung von Nierenschnitten auf der CAM gesucht: Es kamen 16 unterschiedliche Abdeckungen zum Einsatz, die das Gewebe vor Austrocknung schützen und das Anwachsen auf der CAM begünstigen sollten. Zudem wurden verschiedene Medien mit Zusatz von Wachstumsfaktoren getestet, um eine optimale Nährstoffversorgung der Nierenschnitte zu ermöglichen. Durch tägliche Exokulation mehrerer Nierenschnitte wurde darüber hinaus die optimale Versuchsdauer ausgetestet, so dass eine Kultivierung der Schnitte über einen möglichst langen Zeitraum mit möglichst geringem Schaden zu ermöglichen.

4.1 Allgemeine Beurteilung der Ergebnisse

Zur Beurteilung des Erhalts des Nierengewebes nach Kultivierung auf der CAM anhand HE-gefärbter histologischer Präparate wurde ein Schädigungsscore erstellt, der sich an bestehenden nephropathologischen Bewertungssystemen orientiert (56–60). Dieser Score sollte die wesentlichen, im HE-Präparat auffälligen Veränderungen, die sich durch die *ex vivo* Kultivierung ergeben und einem Schädigungsmuster nach einer Ischämie-Reperfusionsverletzung ähneln, erfassen (8, 61). Dabei handelt es sich um eine selbsterstellte, semiquantitative Einteilung in Kategorien mit einer Graduierung in 5 Abstufungen von 0 (schlecht) bis 4 (gut), sie dient jedoch v. a. dazu, die Nierenschnitte untereinander vergleichbar zu machen und sollte nicht absolut gesehen werden.

Bei der Analyse der Untersuchungsreihe fiel auf, dass grundsätzlich die peripheren Gebiete in den Präparaten, die dem Rindenbereich der Niere entsprechen, besser erhalten waren, während zentral im Nierenmark das Ausmaß an Nekrosen bestimmend war. Ähnliche histologische Auffälligkeiten sind aus früheren Experimenten im CAM-Modell mit Nieren von Ratten, Hamstern und Enten bekannt (49, 51). Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu detektieren, wurde die Auswertung deshalb an den peripheren Zonen der Präparate durchgeführt.

Generell konnten im HE-Präparat an den Nierenkörperchen im Vergleich zum Primärmaterial ein Verlust und Veränderungen der glomerulären Zellkerne bezüglich ihrer Größe, Anfärbbarkeit und Form festgestellt werden. Zellkerne mit Zeichen einer Karyopyknose, Karyorrhesis mit apoptotischen Körperchen und Karyolyse oder mit

besonders schwacher Anfärbbarkeit wurden als atypische Zellkerne identifiziert und spiegeln das jeweilige Ausmaß an Apoptosen und Nekrosen der Nierenkörperchen wider (11, 60). Zudem führte die Kultivierung zu einer Erweiterung des glomerulären Kapselraumes und dessen Füllung mit hyalinem Material, was vermutlich durch die Akkumulation von Urinprodukten, aufgelösten Zellen und Erythrozyten entsteht und somit bei vermehrtem Vorkommen ein Zeichen größeren Schadens ist.

Die beobachteten Veränderungen des tubulointerstitiellen Raumes umfassen neben den oben beschriebenen Veränderungen und Verlusten an Zellkernen weitere Aspekte: Ähnlich wie im glomerulären Kapselraum konnte im Tubuluslumen eine unterschiedlich ausgeprägte Erweiterung und Füllung nachgewiesen werden. Dabei könnte es sich um eine Mischung aus abgeschilferten Bürstensaum, abgelösten Zellen, Komplement und Immunglobuline sowie verklumpte Proteine und andere Harnbestandteile handeln. Manche Tubuli waren in ihrer Gesamtheit besser erhalten als andere, was in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits festgehalten wurde. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung auf Uromodulin, welches als Markerprotein für den proximalen Tubulus gilt, konnte nachgewiesen werden, dass die proximalen Tubuli grundsätzlich weniger empfindlich gegenüber der hypoxischen Bedingungen auf der CAM waren als andere Nephronabschnitte und deshalb besser erhalten blieben (8). Solche Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, können sich aber zur detaillierten Untersuchung in weiteren Studien anschließen.

Auffällig war, dass in allen Präparaten an der Verwachsungszone der Niere mit der CAM ein Areal zu sehen war, in der das Nierenparenchym keine Zellkerne aufwies bzw. die Zellen sich in Auflösung befanden. Zudem waren in diesem Bereich Ansammlungen monomorpher Zellkerne und einzelne Hühnererythrozyten zu beobachten. Um was es sich morphologisch bei diesen Zellansammlungen handelt, müsste in weiteren Untersuchungen, beispielsweise durch immunhistochemische Färbungen erforscht werden. Mit längerer Kultivierungszeit wurde die Ausdehnung dieser Zone größer. Dabei zeigte sich kaum ein Gradient, sondern eher eine definierte Grenze zum vitalen Gewebe. Durch das Anschneiden des Gewebes scheint diese Reaktion eher nicht bedingt zu sein, war eine solcher Bereich doch zur Oberfläche hin nicht zu beobachten. Die oberflächlichen Bereiche zur Luftseite hin zeigten atrophes Nierenparenchym in unterschiedlicher Ausdehnung, was die Notwendigkeit einer Abdeckung unterstreicht,

um die durch Austrocknung und Minderversorgung bedingte Schädigung der Niere so gering wie möglich zu halten.

4.2 Bewertung der Abdeckungen nach 7 Tagen Kultivierung

In den ersten Versuchen wurden 16 verschiedene Abdeckungen einem Screening auf ihre Eignung unterzogen, die Vitalität der Nierenschnitte zu verbessern. Es ergaben sich Unterschiede im Ausmaß der Schädigung nach 7 Tagen:

Einige Abdeckungen führten zu einem guten Ergebnis, was ihre Notwendigkeit unterstreicht, um das Anwachsen und die Immobilisation auf der CAM zu beschleunigen sowie den Kontakt zur CAM über den Versuchszeitraum trotz der aktiven Bewegungen des Hühnerembryos zu verbessern. Zudem wird durch eine Abdeckung für eine kontinuierliche, durchdringende Versorgung der Niere mit Nährstoffen des applizierten Mediums gesorgt, was sich in der besser erhaltenen Vitalität des Nierenparenchyms widerspiegelt. Insgesamt waren die Nierenkörperchen in den Präparaten besser erhalten als das Tubulointerstitium und damit leichter zu ernähren. (8, 61) Um beide Kompartimente möglichst vital zu halten, scheint die Bedeckung mit einem dünnen Vlies oder Cellophanfolie am besten geeignet zu sein. Die Untersuchung ergab, dass die beiden Abdeckungen zudem eine geringe Ausdehnung der Schädigung am Übergang des Nierenparenchyms zur CAM aufweisen. Außerdem scheint sich Aclarfolie zu eignen, diese ist jedoch sehr teuer und damit nicht die erste Wahl. Lediglich für einen guten glomerulären, jedoch nicht tubulointerstitiellen Erhalt sorgten zudem die Bedeckung mit Frischhaltefolie und Schwamm.

Cellophanfolie hat den Vorteil, dass sie preiswert und durch ihre Hitzebeständigkeit im Gegensatz zu anderen Folien autoklavierbar ist. Außerdem scheint sie durchlässiger zu sein als Frischhaltefolie, Folie und ein Deckgläschen und daher zu einer besseren Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu führen. Auffällig war, dass vermutlich die mechanische Reizung beim täglichen Wechsel des Cellophans zu teils großen Unterschieden im Erhalt der Nierenschnitte führte. Ein Verzicht auf einen Folienwechsel über den Versuchszeitraum zeigte jedoch keine Verbesserung und erschwerte das Ablösen am Tag der Exokulation. Durch ein Anfeuchten mit Medium vor dem Wechsel oder ein seitliches Einspritzen des Mediums könnte das Handling weiter optimiert werden.

Eine Bedeckung mit Vlies behindert durch seine fehlende Transparenz eine Beobachtung der Entwicklung der Nierenschnitte. Da der gute Erhalt der Vitalität jedoch im Vordergrund steht, bietet sich ein Vlies dennoch als Abdeckung der Nierenschnitte an.

Die Kultivierung als Längsschnitt führte zu einem überdurchschnittlich guten Erhalt des oberflächlichen Nierenparenchyms, da die Niere zur Luftseite hin durch ihre physiologische Kapsel vor Austrocknung geschützt war. Zudem war hier lediglich eine Schnittfläche notwendig. Die Schnitte sollten jedoch bevorzugt mit einem Vibratom gefertigt werden als mit einer Rasierklinge, um trotz schwieriger Schnittführung eine Schnittdicke $< 500\ \mu\text{m}$ und eine bessere Vitalität des Nierengewebes zu erreichen. Der Verbrauch an Nieren und damit an Versuchstieren ist zudem deutlich größer, da eine Niere nur 2–3 Nierenscheiben im Längsschnitt ergibt. Es ist vorstellbar, nach Etablierung des optimierten Protokolls solche Längsschnitte mit ihrer natürlichen Kapsel in Kombination mit einer Bedeckung mit Cellophan oder Vlies zum Einsatz zu bringen.

Eine Bedeckung mit einer Agarosescheibe oder einem Agarosering führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Auffällig war, dass in diesen Präparaten sehr viele Blutgefäße in Richtung der Agarose entwickelten und die Agarosescheiben über den Versuchszeitraum schrumpften. Der Zucker scheint einen Effekt zu haben, der die Vitalität des Nierenparenchyms nicht fördert, sondern vielmehr der Ernährung des Embryos dient.

In der Literatur ist beschrieben, dass die Injektion eines Gels mit Kollagen I in Mäusen eine erfolgreiche Regeneration des Nierengewebes nach vorheriger Ischämie-Reperfusionsschädigung verspricht (62). Der Einsatz eines Kollagengels als Matrix für die Niere sorgte jedoch nicht für einen guten tubulointerstitiellen Erhalt des Gewebes und stellt somit keine erfolgsversprechende Alternative dar.

Andere Materialien (Gartenvlies, Gaze, Filter, Schwamm) waren durch ihre Dichte ebenfalls nicht dazu geeignet, eine adäquate Versorgung der Niere mit Nährstoffen zu erreichen.

Neben einiger dieser Abdeckungen sorgte die Kultivierung mit Matrigel für eine ausgeprägte und stärkere Schädigung des Nierenparenchyms als ohne Abdeckung. Matrigel stellt ein sehr komplexes Gemisch aus über 1800 Proteinen dar, so dass kein eindeutiger Bezug zwischen einer spezifischen Substanz und ihrer Wirkung auf die Nierenphysiologie hergestellt werden kann (63). Im verwendeten Standardmatrigel mit

einer Proteinkonzentration von 9,3 mg/ml waren etwa 60 % Laminin, 30 % Kollagen IV und 8 % Entactin enthalten. Aus Versuchen mit embryonalen Nieren ist bekannt, dass v. a. Laminin und Entactin die Tubulogenese fördern, während viele andere Stoffe, so auch Kollagen IV, eine hemmende Wirkung haben (64). Es ist denkbar, dass diese Substanzen ebenfalls eine Wirkung auf die Niere im ausgereiften Zustand entfalten.

4.3 Veränderungen über den Zeitverlauf einer Woche

Im Zeitverlauf über eine Woche wurde mit steigender Versuchsdauer eine stärkere Schädigung sowohl des glomerulären als auch des tubulointerstitiellen Kompartiments der Mäuseniere nachgewiesen, wenn sie ohne Abdeckung kultiviert wurde. Auch das Schädigungsausmaß am CAM-Übergang und im oberflächlichen Bereich folgte diesem Trend. In früheren Experimenten mit Nieren embryonaler Versuchstiere im CAM-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass das Ausmaß an Nekrosen des Parenchyms mit der Versuchsdauer proportional zusammenhängt (50).

Die größten Veränderungen ergaben sich in den ersten 24 Stunden als Zeichen einer akuten Schädigung und Empfindlichkeit des Nierengewebes gegenüber hypoxischen Bedingungen. Interessanterweise blieb in den darauffolgenden Tagen die Zunahme an Nekrosen und anderer Zeichen der Schädigung v. a. glomerulär, aber auch tubulointerstitiell gering, bevor ab Tag 5 bis Tag 7 eine starke Verschlechterung des Zustandes des Nierenparenchyms zu verzeichnen war. Insgesamt waren im tubulointerstitiellen Raum schon zu einem früheren Zeitpunkt Zeichen aufgelöster Strukturen und interstitieller Zelldetritus nachweisbar, während die Glomeruli länger stabil blieben, was zu früheren Beobachtungen passt (61).

Im Vergleich dazu war in den Nierenschnitten, die 5 Tage lang mit Vlies, Cellophan oder Schwamm kultiviert wurden, ein geringeres Schädigungsausmaß zu beobachten. Zudem nahm die Schädigung bis zur Exokulation nach 7 Tagen nicht so stark zu wie bei der Kultivierung ohne Abdeckung.

In der immunhistochemischen Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Antigen PCNA zum Nachweis proliferierender Zellen in den renalen Strukturen konnten PCNA positive Zellkerne v. a. nach 3–5 Tagen der Kultivierung nachgewiesen werden. Vorher im Zeitraum der akuten Schädigung fand ebenso wenig eine Proliferation

statt wie nach 6 bzw. 7 Tagen. Die Proliferation könnte als Zeichen einer einsetzenden, partiellen Regeneration der Zellen zu werten sein, bevor die Niere, wie lichtmikroskopisch auch beobachtet werden konnte, größeren Schaden nimmt. Auffällig war, dass in der Nähe der CAM mehr Proliferation zu erkennen war.

Wie in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gab es keine Anzeichen für eine Fusion von Nieren- und CAM-Gefäßen, da in der CD31-Färbung Hühnererythrozyten nur in den Arteriolen, jedoch nicht in den peritubulären Kapillaren nachweisbar waren (65). Dass das Ausmaß an CD31-gefärbten Endothelzellen als Zeichen einer Gefäßproliferation an der Übergangszone zwischen CAM und Mäuseniere über den Zeitverlauf einer Woche zunimmt, zeigt, dass während der Kultivierung eine Interaktion und Reaktion der Mäuseniere und CAM aufeinander stattfinden. Da es gerade in dem Bereich, wo die renalen Strukturen lichtmikroskopisch am schlechtesten erhalten sind, zu einem Einsprossen von Gefäßen kommt, legt die Vermutung nahe, dass es hypoxiebedingt über eine Hochregulation des vascular endothelial growth factor (VEGF) zur Stimulation des Gefäßwachstums kommt (66).

In der ultrastrukturellen Analyse mit dem Transmissionselektronenmikroskop konnte eine frühzeitige Schädigung und Auflösung der Tubuli und Glomeruli mit Vakuolenbildung und Zellkernpyknose in den ersten 48 h nachgewiesen werden. Interessanterweise kommt es im Laufe der Woche zu einer Verdickung der Kapsel, einer Verbreiterung der Basalmembran um die Kapillarschlingen sowie gegen Ende der Versuchswochen in einzelnen Arealen zur Einsprossung von Kollagenfibrillen um die Bowman-Kapsel. All diese Mechanismen zeigen eine Fibrosierung an und dienen dazu, toten Raum mit Ersatzmaterial auszufüllen, das zwar weniger Funktion erfüllt als intaktes Nierenparenchym, jedoch umgebene Strukturen stabilisiert (59, 60, 67). Auffällig war zudem, dass die Podozyten mit ihren Fußfortsätzen auch nach 7 Tagen noch teilweise erkennbar waren, während die Endothelzellen, die bekanntermaßen sehr hypoxieempfindlich sind, sich frühzeitig vollständig auflösten. Somit scheinen die Podozyten resistenter gegenüber hypoxischen Bedingungen zu sein.

4.4 Weitere Modellierung der Versuchsbedingungen

Der Einsatz verschiedener Nährmedien zeigte, dass sich RPMI-Medium besser dafür eignet, die Vitalität des Nierenparenchyms aufrechtzuerhalten, als DMEM High Glucose, insbesondere, wenn DMEM mit den substituierten Substanzen eingesetzt wurde. Das substituierte DMEM-Medium wurde bei der *ex vivo* Kultivierung metanephritischer Mäusenieren auf speziellen Filtern etabliert (68). Die zugesetzten Faktoren und Hormone, Insulin, Transferrin, Natriumselenit, Prostaglandin E und Triiodthyronin, unterstützen dort die Nephrogenese, scheinen jedoch auf die renale Struktur adulter, ausgereifter Nieren keine positive Wirkung auszuüben.

Der Einsatz eines Silikonringes mit dem Ziel, den Kontakt der Niere mit der CAM zu verstärken und für eine kontinuierlich feuchte Umgebung zu sorgen, brachte nicht den gewünschten Erfolg. Stattdessen war makroskopisch eine Verdickung der CAM innerhalb des Ringes sowie eine verstärkte Verdrängung des Nierengewebes zu beobachten.

4.5 Zusammenfassung und Optimierungsvorschläge

Im CAM-Modell ist es möglich, Schnitte von Mäusenieren außerhalb des Organismus für einen längeren Zeitraum am Leben zu halten. In der vorliegenden Arbeit wurde das bestehende Protokoll durch Austesten verschiedener Versuchsbedingungen (Abdeckungen, Zeitverlauf, Medien) so weit modifiziert, dass eine deutlich verbesserte Vitalität des Nierenparenchyms erreichbar war. Als gute Abdeckung stellte sich Cellophanfolie und alternativ ein Vlies heraus, die für den nötigen Schutz vor Austrocknung, eine kontinuierliche Nährstoffversorgung und einen guten Kontakt der Niere zur CAM sorgen.

Die Niere sollte nach Entnahme aus der Maus optimalerweise innerhalb weniger Minuten verarbeitet und bereits in der Vorbereitung bis zur Inokulation im Medium gehalten werden. Vor Inokulation sollte die CAM-Oberfläche mit einer Pipettenspitze leicht angeraut werden, um eine Mikroblutung der CAM-Gefäße zu induzieren und das Anwachsen der Niere zu beschleunigen (35). Als Behandlungsmedium bieten sich 100 µl RPMI-Medium an. Es wäre sinnvoll, in der sensiblen Phase zu Beginn des

Versuchszeitraums mehrmals täglich mit Medium zu behandeln, um den anfangs hypoxischen Wachstumsbedingungen entgegenzuwirken.

Um einen möglichst langen Versuchszeitraum mit möglichst geringem Schädigungsausmaß zu haben, würden sich als optimale Versuchsdauer 4 bis 5 Tage bei der Kultivierung ohne Abdeckung anbieten, mit einer Abdeckung verlängert sich der Zeitraum auf max. 7 Tage. Der genaue maximale Zeitraum sollte in weiteren Versuchen für jede Abdeckung individuell eruiert werden. In dieser Arbeit fielen bei der Beurteilung der HE-Präparate keine wesentlichen Unterschiede im Erhalt nach 5 und 7 Tagen unter Vlies und Cellophan auf, interessant wäre jedoch auch eine genauere morphologische Beurteilung mittels Transelektronenmikroskopie.

Ein nächster Schritt wäre nun, die Präparate mittels Immunfluoreszenz auf glomeruläre und tubuläre Marker zu färben, um eine detailliertere Analyse des Vitalitäts- und Schädigungsmusters zu ermöglichen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine wesentliche Grundlage für weitere Untersuchungen patho-/physiologischer Prozesse von adulten Nierengewebe im CAM-Modell geschaffen, die weitreichende Möglichkeiten der Analyse auf molekularer und ultrastruktureller Ebene bietet.

Offen bleibt, wie das zellkernfreie Areal an der Verwachsungszone zwischen Niere und CAM bewertet und in seiner Ausdehnung weiter reduziert werden kann. In der Literatur findet sich eine Methode, die bei der Kultivierung embryonaler Mäusenieren zum Einsatz kommt: Hierbei werden die Nieren nicht direkt auf die CAM gelegt, sondern auf einem durchlässigen Minireservoir, geschnitten aus einem Transwell-Zellkultureinsatz, gelagert, um eine kontinuierliche Versorgung mit dem Nährmedium zu erreichen (69). Ob sich diese Methode auch zur Kultivierung adulter Mäusenieren eignet und gleichzeitig die Reaktion am Übergang zwischen Niere und CAM verhindern kann, sollte in weiteren Versuchen ausgetestet werden.

Darüber hinaus wäre interessant, ob sich durch Zugabe anderer Wachstumsfaktoren und Hormonen das Anwachsen der Niere auf der CAM weiter beschleunigen lässt, um für eine frühzeitige, stabile Nährstoffverfügbarkeit zu sorgen. Neben Faktoren wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder Endothelin-1, die die Angiogenese fördern, wären v. a. Versuche mit dem *hepatocyte growth factor* (HGF) naheliegend (70).

Dieser ist ein bedeutsamer Wachstumsfaktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Architektur des Nierenparenchyms (64). Er wirkt z. B. in *in-vivo*-Versuchen mit Ratten mitogen und beeinflusst die Morphologie von Nierenepithelzellen (64, 71). Zudem wird HGF bei der Regeneration nach einer Ischämie der Niere in seiner Expression hochreguliert und kann durch intravenöse Injektion in Mäusen mit akutem Nierenversagen die Synthese von Nierentubuluszellen stimulieren (71). Neben HGF könnten weitere Wachstumsfaktoren untersucht werden, beispielsweise verschiedene Liganden des *epidermal growth factor*-Rezeptors (EGFR), deren Einfluss auf die Tubulogenese in der Nierenentwicklung nachgewiesen ist (72).

Es ist allgemein bekannt, dass weibliche Mäuse weniger empfindlicher auf Hypoxie reagieren als männliche und widerstandsfähiger sind (14). Da der Fokus dieser Arbeit auf Versuchen mit männlichen Mäusen lag, wäre es wichtig, die Ergebnisse mit der Physiologie von Nieren weiblicher Mäuse zu vergleichen, um einen möglichen „Gender-Effekt“ zu detektieren.

Interessant wäre außerdem, ob es leichter umsetzbar ist, Nieren erkrankter Mäuse auf der CAM zu kultivieren unter der Annahme, dass diese bedingt durch die Krankheit besser an hypoxische Bedingungen angepasst sind, was ihre Überlebensfähigkeit in der avaskulären Phase auf der CAM bis zum Anschluss an das Kapillarsystem positiv beeinflussen könnte (35).

4.6 Ausblick auf weitere Forschungsanwendungen

Es wird zunehmend daran geforscht, histopathologische, insbesondere nephropathologische Gewebefärbungen bildbasiert mittels künstlicher Intelligenz (KI) und Deep-Learning-Ansätzen (DL) auswerten zu können (73). Bisher ist es möglich, durch Algorithmen PAS-Färbungen von Nierenschnitten zu segmentieren (74). Ein Ziel dieser Bildverarbeitung könnte sein, auch HE-Färbungen von Nierenschnitten schnell, automatisiert und reproduzierbar zu segmentieren und quantitativ auszuwerten, um weitere Aussagen zu den verschiedenen Wachstumsbedingungen zu treffen (75).

Wichtig wäre außerdem, die Interaktion zwischen Niere und Hühnerembryo besser zu verstehen, wofür sich der Einsatz mit Immunfluoreszenz markierter Hühnereier anbietet, da hiermit eindeutig die Herkunft infiltrierender Zellen innerhalb des inokulierten

Nierengewebes dem Huhn zugeordnet werden könnte. Zudem wäre interessant, zu untersuchen, wie lange es dauert, bis die Nieren Anschluss an die CAM-Gefäße bekommen und wann auf eine avaskuläre die vaskuläre Phase folgt (35). Dieser Fragestellung könnte mittels ultrafrequenter Ultraschalluntersuchungen *in ovo* - einem Verfahren, das in unserer Arbeitsgruppe kürzlich etabliert wurde, nachgegangen werden.

Übergeordnetes Ziel ist es, das CAM-Modell als 3D-*in-vivo*-Modell zur Bearbeitung nephrologischer Fragestellungen zu etablieren, um die Pathophysiologie an Schnitten krankhaft veränderter Nieren von Mäusen, aber auch an humanem, beispielsweise aus Tumornephrektomien stammenden Material von Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung untersuchen zu können. Aus dem Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe auf der Forschung zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) ergibt sich ein besonderes Interesse daran, Schnitte von ADPKD-Mäusen auf der CAM zu kultivieren, um die pathophysiologischen Prozesse dieser Krankheit besser nachzuvollziehen (8). Daneben ist es denkbar, das CAM-Modell für die Untersuchung verschiedener anderer Formen der akuten oder chronischen Nierenschädigung zu nutzen und den Beitrag endogener und exogener Pathomechanismen zur Entzündung, Fibrose oder verschiedener anderer Formen der Schädigung zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Das sog. Chorionallantoismembran-Modell (CAM-Modell) stellt eine Alternative zum klassischen Tierversuch dar und bietet neue Untersuchungsmöglichkeiten nephrologischer Fragestellungen. Für die Kultivierung embryonaler Mäusenieren wird das Modell bereits eingesetzt, adulte Mäusenieren *ex vivo* in Kultur zu halten, ist bisher nur für einige Stunden möglich – gleichwohl es wertvoll wäre, auf diese Weise pathophysiologische Mechanismen verschiedener Formen der Nierenschädigung zu untersuchen.

Ziel der Arbeit war es, Bedingungen zu schaffen, unter denen adultes Mäusenierengewebe über einen längeren Zeitraum außerhalb des Organismus am Leben gehalten werden kann, um physiologische Prozesse am vitalen Gewebe zu untersuchen.

Insgesamt wurden hunderte Schnitte von Nieren gesunder, adulter Mäuse für mehrere Tage auf der CAM kultiviert und unterschiedliche Abdeckungen (z. B. Aclarfolie, Kollagen, Cellophan, Schwamm und Vlies) sowie verschiedene Medien und Wachstumsfaktoren verglichen. Zudem wurden täglich Schnitte entnommen, um morphologische Veränderungen über den Zeitraum einer Woche zu beurteilen. Die Auswertung erfolgte histologisch anhand verschiedener Färbungen sowie durch eine eigens etablierte semiquantitative Beurteilung des Schädigungsausmaßes des renalen Gewebes anhand histomorphologischer Kriterien (z. B. Zellularität und Zellkernveränderungen).

Es konnten die Versuchsbedingungen so weit optimiert werden, dass auch nach einer Woche eine deutlich verbesserte Vitalität des Nierenparenchyms im HE-Präparat vorlag. Als geeignete Abdeckung erwiesen sich eine Cellophanfolie, die täglich zur Behandlung mit dem Nährmedium gewechselt wird bzw. ein dünnes Vlies. Beide Abdeckungsformen sorgten dafür, das Gewebe vor Austrocknung zu schützen und eine konstante Nährstoffversorgung über den Versuchszeitraum aufrechtzuerhalten. Die HE-Präparate zeigten, verglichen mit den anderen Abdeckungen, einen besseren Erhalt der glomerulären und tubulären Zellkerne und Zellstrukturen. Ohne Abdeckung erschien eine Versuchsdauer von 5 Tagen für einen minimalen Schaden optimal, mit entsprechender Abdeckung könnte sich der Zeitraum weiter verlängern.

Mit dem in dieser Arbeit optimierten Protokoll kann das CAM-Modell als *in vivo* Kultivierungsmethode für adulte Mäusenieren ein breites Spektrum an nierenbezogenen Fragestellungen eröffnen.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Medien mit Angabe der Bezugsquellen	22
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen mit Angabe der Zusammensetzung	23
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Bezugsquellen.....	24
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Software-Programme mit Angabe einer zugehörigen Referenz	24
Tabelle 5: Überblick über die eingesetzten Abdeckungen	29
Tabelle 6: Glomerulärer Schädigungsscore.....	35
Tabelle 7: Tubulointerstitieller Schädigungsscore	36
Tabelle 8: Schädigungsscore für den CAM-Übergang	36
Tabelle 9: Schädigungsscore für die Oberfläche	37
Tabelle 10: Beurteilung der Versuchsbedingungen	42

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema einer humanen Niere.....	7
Abb. 2: Schema eines Nierenkörperchens	9
Abb. 3: Vergleich einer murinen und humanen Niere	14
Abb. 4: Aufbau und Anwendung des CAM-Modells.....	19
Abb. 5: Anwendung des CAM-Modells auf die Kultivierung von Mäusenieren:	21
Abb. 6: Ablauf eines Experiments im CAM-Modell (erstellt mit biorender.com).....	25
Abb. 7: Arbeitsschnitte vor Inokulation des Gewebes.....	27
Abb. 8: Nierenschnitte nach Exokulation in der Ansicht von unten.....	28
Abb. 9: Nierenschnitte unter verschiedenen Abdeckungen	29
Abb. 10: Bilder von exemplarischen Nierenschnitten	38
Abb. 11: Vergleich der Nierenschnitte anhand des makroskopischen Beurteilungsscores	39
Abb. 12: Nierenschnitte mit Cellophan (oben) und Längsschnitte mit Kapsel (unten)	39

Abb. 13: Nierenschnitte mit Agarosescheibe (oben) und Matrigel (unten).....	40
Abb. 14: Nierenschnitte mit Deckgläschen (oben) und Aclarfolie (unten).....	40
Abb. 15: Makroskopischer Beurteilungsscore der Nierenschnitte mit und ohne Ring	41
Abb. 16: Nierenschnitte ohne Abdeckung mit Ring (oben) und mit Kollagen und Ring (unten):	41
Abb. 17: Exemplarische Nierenschnitte nach 7 Tagen in der Übersicht	43
Abb. 18: Glomerulärer Schädigungsscore für alle Abdeckungen	44
Abb. 19: Glomeruläre Ausschnitte in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) von Primärmaterial und Nierenschnitten ohne Abdeckung und mit Gartenvlies	45
Abb. 20: Glomeruläre Ausschnitte in 20facher (oben) und 60facher Vergrößerung (unten) von einem Längsschnitt mit Kapsel sowie Nierenschnitten mit Aclarfolie, Kollagen, Vlies, Schwamm und Cellophan (mit Wechsel)	46
Abb. 21: Tubulointerstitieller Schädigungsscore für alle Abdeckungen	47
Abb. 22: Tubulointerstitielle Ausschnitte in 20facher (oben) und 40facher Vergrößerung (unten) von Primärmaterial und Nierenschnitten ohne Abdeckung und mit Gartenvlies.....	48
Abb. 23: Tubulointerstitielle Ausschnitte in 20facher (oben) und 40facher Vergrößerung (unten) von einem Längsschnitt mit Kapsel sowie Nierenschnitten mit Aclarfolie, Kollagen, Vlies, Schwamm und Cellophan mit Wechsel	49
Abb. 24: Schädigungsausmaß am CAM-Übergang.....	50
Abb. 25: CAM-Übergang in verschiedenen Nierenschnitten.....	51
Abb. 26: Schädigungsausmaß an der Oberfläche	52
Abb. 27: Oberflächliche Zone in exemplarischen Nierenschnitten.....	53
Abb. 28: Exemplarische Nierenschnitte ohne Abdeckung in der Übersicht	54
Abb. 29: Glomeruläre Ausschnitte im Zeitverlauf.....	55
Abb. 30: Gesamtscore der glomerulären Schädigung	55
Abb. 31: Glomeruläre Zellularität und Zellkernveränderungen	56
Abb. 32: Füllung des glomerulären Kapselraumes im Zeitverlauf.....	57
Abb. 33: Tubulointerstitielle Ausschnitte im Zeitverlauf	58
Abb. 34: Gesamtscore der tubulointerstitiellen Schädigung	59
Abb. 35: Tubulointerstitielle Zellularität und Zelldetritus	60
Abb. 36: Füllung des Tubuluslumens und Tubulusatrophie im Zeitverlauf	61
Abb. 37: Schädigung am CAM-Übergang im Zeitverlauf	62

Abb. 38: CAM-Übergang in Nierenschnitten an verschiedenen Zeitpunkten	62
Abb. 39: Hühnererythrozyten am CAM-Übergang	63
Abb. 40: Schädigung der Oberfläche im Zeitverlauf	63
Abb. 41: Oberflächliche Schädigung der Nierenschnitte im Zeitverlauf	64
Abb. 42: CD31-gefärbte Zellen im Zeitverlauf.....	64
Abb. 43: PCNA-positive Zellen im Zeitverlauf.....	65
Abb. 44: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen im Zeitverlauf	66
Abb. 45: Elektronenmikroskopische Aufnahmen im Zeitverlauf im Vergleich zum Primärmaterial	67
Abb. 46: Exemplarische Nierenschnitte nach 5 Tagen in der Übersicht	68
Abb. 47: Glomerulärer Schädigungsscore für verschiedene Abdeckungen.....	68
Abb. 48: Glomeruläre Schädigung nach 5 Tagen.....	69
Abb. 49: Tubulointerstitieller Schädigungsscore für verschiedene Abdeckungen.....	70
Abb. 50: Tubulointerstitielle Schädigung nach 5 Tagen.....	71
Abb. 51: Schädigungsscore CAM-Übergang für verschiedene Abdeckungen.....	72
Abb. 52: CAM-Übergang nach 5 Tagen	72
Abb. 53: Schädigung der Oberfläche für verschiedene Abdeckungen	73
Abb. 54: Schädigungsausmaß an der Oberfläche nach 5 Tagen	73

7 Literaturverzeichnis

1. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. Histologie. 6. Auflage. Heidelberg: Springer; 2005.
2. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. Physiologie: Das Lehrbuch. 7. Auflage. München: Elsevier; 2019.
3. Bleich M, Lang F. Niere. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 395–470.
4. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Klink R, Brenner B, Hrsg. Physiologie. 7. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2014.
5. Cabrita I, Kraus A, Scholz JK, Skoczynski K, Schreiber R, Kunzelmann K et al. Cyst growth in ADPKD is prevented by pharmacological and genetic inhibition of

- TMEM16A in vivo. *Nat Commun* 2020; 11(1):1–13. doi: 10.1038/s41467-020-18104-5.
6. Tan Y-C, Blumenfeld J, Rennert H. Autosomal dominant polycystic kidney disease: genetics, mutations and microRNAs. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(10):1202–12. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.03.002.
 7. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7(10):556–66. doi: 10.1038/nrneph.2011.109.
 8. Bichlmayer E-M, Mahl L, Hesse L, Pion E, Haller V, Moehwald A et al. A 3D In Vivo Model for Studying Human Renal Cystic Tissue and Mouse Kidney Slices. *Cells* 2022; 11(15):1–23. doi: 10.3390/cells11152269.
 9. Anderhuber F, Filler Timm J., Pera F, Peuker ET. Innere Organe in Thorax, Abdomen und Becken. In: Anderhuber F, Pera F, Streicher J, Hrsg. *Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band*. 19. Auflage. Berlin [u.a.]: DE GRUYTER; 2012. S. 581–91.
 10. Schiebler TH, Korf H-W. *Anatomie: Histologie Entwicklungsgeschichte makroskopische und mikroskopische Anatomie Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen*. 10. Auflage. Heidelberg: Steinkopff; 2007.
 11. Welsch U, Deller T, Kummer W. *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
 12. Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. 4. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996. (Springer-Lehrbuch).
 13. Wiesner RJ. Niere. In: Fahlke C, Linke W, Rassler B, Wiesner RJ, Hrsg. *Taschenatlas Physiologie*. 2. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2015. S. 266–97.
 14. Treuting PM, Kowalewska J. Urinary System. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, Hrsg. *Comparative anatomy and histology*. 2. Auflage. London: Academic Press; 2018. S. 229–51.

15. Czogalla J, Schweda F, Loffing J. The Mouse Isolated Perfused Kidney Technique. *J Vis Exp* 2016; (117):1–9. doi: 10.3791/54712.
16. Westra IM, Pham BT, Groothuis GMM, Olinga P. Evaluation of fibrosis in precision-cut tissue slices. *Xenobiotica* 2013; 43(1):1–15. doi: 10.3109/00498254.2012.723151.
17. Rao R, Omi K, Rajani R, Li H, Pastor-Soler NM. Using Ex Vivo Kidney Slices to Study AMPK Effects on Kidney Proteins. *Methods Mol Biol* 2018; (1732):449–64. doi: 10.1007/978-1-4939-7598-3_28.
18. Poosti F, Pham BT, Oosterhuis D, Poelstra K, van Goor H, Olinga P et al. Precision-cut kidney slices (PCKS) to study development of renal fibrosis and efficacy of drug targeting ex vivo. *Dis Model Mech* 2015; 8(10):1227–36. doi: 10.1242/dmm.020172.
19. Ruigrok MJR, Maggan N, Willaert D, Frijlink HW, Melgert BN, Olinga P et al. siRNA-Mediated RNA Interference in Precision-Cut Tissue Slices Prepared from Mouse Lung and Kidney. *AAPS J* 2017; 19(6):1855–63. doi: 10.1208/s12248-017-0136-y.
20. Schneider-Stock R, Ribatti D. The CAM Assay as an Alternative In Vivo Model for Drug Testing. *Handb Exp Pharmacol* 2021; 265:303–23. doi: 10.1007/164_2020_375.
21. Brähler S, Yu H, Suleiman H, Krishnan GM, Saunders BT, Kopp JB et al. Intravital and Kidney Slice Imaging of Podocyte Membrane Dynamics. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2016; 27(11):3285–90. doi: 10.1681/ASN.2015121303.
22. Peti-Peterdi J, Kidokoro K, Riquier-Brison A. Intravital imaging in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2016; 25(3):168–73. doi: 10.1097/MNH.0000000000000219.
23. Trowell OA. A modified technique for organ culture in vitro. *Experimental Cell Research* 1954; 6(1):246–8. doi: 10.1016/0014-4827(54)90169-X.
24. Ihermann-Hella A, Kuure S. Mouse ex vivo kidney culture methods. In: Vainio S, Hrsg. *Kidney Organogenesis: Methods and Protocols: Methods Mol Biol*; 2019. S. 23–30 (vol. 1926).

25. Aresh B, Peuckert C. Dissection and Culture of Mouse Embryonic Kidney. *J Vis Exp* 2017; (123):1–5. doi: 10.3791/55715.
26. Saxén L, Lehtonen E. Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation* 1987; 36(1):2–11. doi: 10.1111/j.1432-0436.1987.tb00176.x.
27. Barak H, Boyle SC. Organ culture and immunostaining of mouse embryonic kidneys. *Cold Spring Harbor protocols* 2011; (1):86-95. doi: 10.1101/pdb.prot5558.
28. Giuliani S, Perin L, Sedrakyan S, Kokorowski P, Jin D, Filippo R de. Ex vivo whole embryonic kidney culture: a novel method for research in development, regeneration and transplantation. *The Journal of urology* 2008; 179(1):365–70. doi: 10.1016/j.juro.2007.08.092.
29. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Metanephric organ culture. In: Weimbs T, Hrsg. *Methods in Cell Biology: Methods Cell Biol*; 2019. S. 169–83 (vol. 153).
30. Berndt WO. Use of the tissue slice technique for evaluation of renal transport processes. *Environ Health Perspect* 1976; 15:73–88. doi: 10.1289/ehp.761573.
31. Bigaeva E, Gore E, Mutsaers HAM, Oosterhuis D, Kim YO, Schuppan D et al. Exploring organ-specific features of fibrogenesis using murine precision-cut tissue slices. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 2020; 1866(1):1–14. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165582.
32. Saitta B, Jalili MF, Zohoorkari H, Rao R, Hallows KR, Baty CJ et al. Ex vivo kidney slice preparations as a model system to study signaling cascades in kidney epithelial cells. *Methods Cell Biol* 2019; 153:1–19. doi: 10.1016/bs.mcb.2019.04.017.
33. Forster RP. Use of Thin Kidney Slices and Isolated Renal Tubules for Direct Study of Cellular Transport Kinetics. *Science* 1948; 108(2794):65–7. doi: 10.1126/science.108.2794.65.b.
34. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 2014; 17(4):779–804. doi: 10.1007/s10456-014-9440-7.
35. Kunz P, Schenker A, Sähr H, Lehner B, Fellenberg J. Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable in vivo model for the analysis of osteosarcoma. *PLoS One* 2019; 14(4):1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0215312.

36. Feder A-L, Pion E, Troebs J, Lenze U, Prantl L, Htwe MM et al. Extended analysis of intratumoral heterogeneity of primary osteosarcoma tissue using 3D-in-vivo-tumor-model. *Clin Hemorheol Microcirc* 2020; 76(2):133–41. doi: 10.3233/CH-209204.
37. Kuri PM, Pion E, Mahl L, Kainz P, Schwarz S, Brochhausen C et al. Deep Learning-Based Image Analysis for the Quantification of Tumor-Induced Angiogenesis in the 3D In Vivo Tumor Model-Establishment and Addition to Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI). *Cells* 2022; 11(15). doi: 10.3390/cells11152321.
38. Bellairs R, Osmond M. Extra-Embryonic Membranes. In: Bellairs R, Osmond M, Hrsg. *Atlas of Chick Development*: Elsevier; 2014. S. 127–9.
39. Fitze-Gschwind V. Zur Entwicklung der Chorioallantoismembran des Hühnchens. Berlin, Heidelberg: Springer; 1973. (Bd. 47).
40. DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, Feinberg RN. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc Res* 1989; 38(2):136–47. doi: 10.1016/0026-2862(89)90022-8.
41. Janković BD, Isaković K, Lukić ML, Vujanović NL, Petrović S, Marković BM. Immunological capacity of the chicken embryo: Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. *Immunology* 1975; 29(3):497–508.
42. Murphy JB, Rous P. The behaviour of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *journal of experimental medicine* 1912:119–32.
43. Kohl C, Aung T, Haerteis S, Ignatov A, Ortmann O, Papatthemelis T. The 3D in vivo chorioallantoic membrane model and its role in breast cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022; 148(5):1033–43. doi: 10.1007/s00432-022-03936-z.
44. Sharrow AC, Ishihara M, Hu J, Kim IH, Wu L. Using the Chicken Chorioallantoic Membrane In Vivo Model to Study Gynecological and Urological Cancers. *J Vis Exp* 2020; (155). doi: 10.3791/60651.
45. Rosenbruch M. Zur Sensitivität des Embryos im bebrüteten Hühnerei. *ALTEX* 1997; 14(3):111–3.

46. EU. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere 2010:33–79.
47. Tierschutzgesetz; 1972/2013. Verfügbar unter: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/TierSchG.pdf>.
48. Kirschner KM. Reduce, replace, refine-Animal experiments. *Acta Physiol (Oxf)* 2021; 233(3):1-3. doi: 10.1111/apha.13726.
49. Sandstrom CJ. The Growth and Differentiation of Duck Kidney Tissue on the Chorio-Allantoic Membrane of the Chick and Duck. *Physiological Zoology* 1932; 5(3):354–74. doi: 10.1086/physzool.5.3.30151170.
50. SWARTZ GE. Heteroplastic transplantation of variously aged intact and macerated kidney tissue of the rat to the chorio-allantoic membrane of the chick. *J Exp Zool* 1946; 103(2):335–63. doi: 10.1002/jez.1401030207.
51. SWARTZ GE. Transplantation of metanephric tissue of the hamster to the chorio-allantoic membrane of the chick. *J Exp Zool* 1951; 116(2):363–75. doi: 10.1002/jez.1401160207.
52. Sariola H, Ekblom P, Lehtonen E, Saxén L. Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on the chorioallantoic membrane. *Developmental biology* 1983; 96(2):427–35. doi: 10.1016/0012-1606(83)90180-x.
53. Preminger GM, Koch WE, Fried FA, Mandell J. Utilization of the chick chorioallantoic membrane for in vitro growth of the embryonic murine kidney. *Am J Anat* 1980; 159(1):17–24. doi: 10.1002/aja.1001590103.
54. Sandstrom C, Kauer J. The growth and differentiation of macerated embryonic duck kidney tissue on the chorio-allantoic membrane of the chick. *the anatomical record* 1933; 57(2):105–17. doi: 10.1002/ar.1090570202.
55. Murphy JB. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species: Its bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 1913; 17(4):482–93. doi: 10.1084/jem.17.4.482.
56. Markus Heinecke. Analyse der Effekte einer direkten Stimulation der löslichen Guanylatzyklase auf die Entwicklung der diabetischen Nephropathie in der Ratte. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität; 2009.

57. el Nahas AM, Zoob SN, Evans DJ, Rees AJ. Chronic renal failure after nephrotoxic nephritis in rats: contributions to progression. *Kidney Int* 1987; 32(2):173–80. doi: 10.1038/ki.1987.189.
58. Schäfer H. Einfluss der Körperkerntemperatur auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2016.
59. Amann K, Benz K. Methodik der Nierenbiopsieanalyse: Was ist bewährt? Was wird kommen? *Nephrologe* 2008; 3(3):182–9. doi: 10.1007/s11560-008-0149-8.
60. Fogo AB, Cohen Arthur H., Colvin Robert B., Jennette J. Charles, Alpers Charles E. *Fundamentals of Renal Pathology*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
61. Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1999; 56(4):1299–304. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00701.x.
62. Lee SJ, Wang H-J, Kim T-H, Choi JS, Kulkarni G, Jackson JD et al. In Situ Tissue Regeneration of Renal Tissue Induced by Collagen Hydrogel Injection. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(2):241–50. doi: 10.1002/sctm.16-0361.
63. Kozlowski MT, Crook CJ, Ku HT. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol* 2021; 4(1):1–15. doi: 10.1038/s42003-021-02910-8.
64. Cantley LG, Barros EJ, Gandhi M, Rauchman M, Nigam SK. Regulation of mitogenesis, motogenesis, and tubulogenesis by hepatocyte growth factor in renal collecting duct cells. *Am J Physiol* 1994; 267(2):271-80. doi: 10.1152/ajprenal.1994.267.2.F271.
65. Fahlke C, Linke W, Rassler B, Wiesner RJ, Hrsg. *Taschenatlas Physiologie*. 2. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2015.
66. Kraus A, Peters DJM, Klanke B, Weidemann A, Willam C, Schley G et al. HIF-1 α promotes cyst progression in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2018; 94(5):887–99. doi: 10.1016/j.kint.2018.06.008.
67. Fogo AB, Kashgarian M. *Diagnostic atlas of renal pathology*. 3. Auflage. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.

68. Schley G, Scholz H, Kraus A, Hackenbeck T, Klanke B, Willam C et al. Hypoxia inhibits nephrogenesis through paracrine Vegfa despite the ability to enhance tubulogenesis. *Kidney Int* 2015; 88(6):1283–92. doi: 10.1038/ki.2015.214.
69. Kaisto S, Saarela U, Dönges L, Raykhel I, Skovorodkin I, Vainio SJ. Optimization of Renal Organoid and Organotypic Culture for Vascularization, Extended Development, and Improved Microscopy Imaging. *J Vis Exp* 2020; (157):1–7. doi: 10.3791/60995.
70. Cruz A, Parnot C, Ribatti D, Corvol P, Gasc JM. Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Vasc Res* 2001; 38(6):536–45. doi: 10.1159/000051089.
71. Igawa T, Matsumoto K, Kanda S, Saito Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am J Physiol* 1993; 265(2):61-69. doi: 10.1152/ajprenal.1993.265.1.F61.
72. Sakurai H, Barros EJ, Tsukamoto T, Barasch J, Nigam SK. An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12):6279–84. doi: 10.1073/pnas.94.12.6279.
73. Gadermayr M, Gupta L, Appel V, Boor P, Klinkhammer BM, Merhof D. Generative Adversarial Networks for Facilitating Stain-Independent Supervised and Unsupervised Segmentation: A Study on Kidney Histology. *IEEE Trans Med Imaging* 2019; 38(10):2293–302. doi: 10.1109/TMI.2019.2899364.
74. Bouteldja N, Klinkhammer BM, Bülow RD, Droste P, Otten SW, Freifrau von Stillfried S et al. Deep Learning-Based Segmentation and Quantification in Experimental Kidney Histopathology. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2021; 32(1):52–68. doi: 10.1681/ASN.2020050597.
75. Berijanian M, Schaadt NS, Huang B, Lotz J, Feuerhake F, Merhof D. Unsupervised many-to-many stain translation for histological image augmentation to improve classification accuracy. *J Pathol Inform* 2023; 14:1–8. doi: 10.1016/j.jpi.2023.100195.

8 Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Universität Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Kultivierung von Mäusenierenschnitten in einem 3D-*in-vivo*-Modell“ am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg unter Betreuung von Prof. Dr. Silke Härteis durchgeführt habe, die die vorliegende Dissertation angeregt und während der Ausarbeitung überwacht hat.

Weiterhin erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Silke Härteis bedanken, die mir die Möglichkeit zur Promotion am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie gab, mir ermöglichte, verschiedenste Untersuchungsmöglichkeiten in der Forschung kennenzulernen und mir bei Fragen stets zur Verfügung stand.

Mein herzlicher Dank geht zudem an Frau Lucia Hofmann für Ihre fachliche Unterstützung im Labor bei allen Aufgaben und Schwierigkeiten. Vielen Dank, liebe Lucia, für die herzliche Betreuung!

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Vera Rötzer bedanken, die mir bei der Auswertung und Ausformulierung meiner Arbeit mit ihrer wissenschaftlichen Erfahrung eine große Hilfe war.

Ein herzlicher Dank geht auch nach Erlangen an Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Daniel und Herrn PD Dr. Björn Buchholz für die fachliche Unterstützung.

Vielen Dank auch an all die Studentischen Hilfskräfte des Lehrstuhls, die mir bei den Versuchen und der histologischen Verarbeitung der Präparate geholfen haben.