

Aus der
Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Inflammation und Fibrose im neonatalen Tiermodell
der obstruktiven Uropathie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Teresa Singer

aus
Memmingen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bärbel Lange-Sperandio
Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Chaloupka

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	6
1 Einleitung	8
1.1 Konnatale obstruktive Uropathie - klinische Bedeutung.....	8
1.1.1 Definition und Ätiologie.....	8
1.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose	10
1.1.3 Biomarker.....	13
1.2 Pathogenese der konnatalen obstruktiven Uropathie	14
1.2.1 Die physiologische Nieren - und Harnleiterentwicklung	14
1.2.2 Pathogenese.....	16
1.3 Neonatales Tiermodell der obstruktiven Uropathie.....	17
1.4 Pathophysiologische Veränderungen nach unilateraler Ureterligatur (UUO) ...	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Versuchstiere	20
2.1.1 Tierart	20
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung und Durchführung der Tierversuche	20
2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik	21
2.2.1 Unilaterale Ureterligatur	21
2.2.2 Scheinoperation	21
2.3 Organentnahme	21
2.4 Studienprotokoll	22
2.4.1 Studienprotokoll - Experimentalgruppe und Kontrollgruppe	22
2.5 Histomorphologische und immunhistochemische Methoden	23
2.5.1 Paraffineinbettung der Nieren und Anfertigung von Mikroschnitten	23
2.5.2 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der T- Lymphozyteninfiltration	24

2.5.3	Histologische Färbung und morphometrische Analyse der M2-Makrophageninfiltration	25
2.5.4	Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen Apoptose ...	26
2.5.5	Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen Proliferation	27
2.5.6	Histologische Färbung und morphometrische Analyse der tubulären Atrophie ..	28
2.5.7	Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen interstitiellen Fibrose	28
2.6	Western Blots	30
2.7	Statistik	31
2.8	Chemikalien	31
3	Ergebnisse	34
3.1	Körpergewichtsentwicklung und Morphologie der neonatalen Mausniere nach unilateraler Ureterligatur	34
3.2	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Lymphozyteninfiltration	34
3.3	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Makrophageninfiltration	36
3.4	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Proliferation	38
3.5	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die renale Apoptose	41
3.6	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die renale interstitielle Fibrose	45
3.7	Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die tubuläre Atrophie	50
3.8	Western Blots	53
3.8.1	Nachweis der Galectin-3-Expression in der neonatalen UUO-Niere	53
3.8.2	Nachweis der Caspase-8-Expression in der neonatalen Niere	54
3.8.3	Nachweis der α -SMA-Expression in der neonatalen Niere	55
3.8.4	Nachweis der PDGFR- β -Expression in der neonatalen Niere	56
4	Diskussion	58
4.1	T-Lymphozyteninfiltration	58
4.2	Makrophageninfiltration	60
4.3	Proliferation	65
4.4	Apoptose	67
4.5	Interstitielle Fibrose	71

4.6	Tubuläre Atrophie	74
4.7	Scheinoperation.....	75
5	Ausblick	76
	Literaturverzeichnis	77
	Abbildungsverzeichnis.....	88
	Tabellenverzeichnis.....	91
	Publikationen.....	93
	Danksagung	94
	Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung.....	95
	Eidesstattliche Versicherung	96

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAKUT	<i>Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract</i>
CCL2	<i>CC-chemokine ligand 2 (MCP-1)</i>
CCR1	CC chemokine receptor type 1
CCR5	CC motive chemokine receptor type 5
CPT1a	<i>Carnitine palmitoyl transferase 1a</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSF1	Colony-stimulating factor 1
CSF-1R	<i>Colony-stimulating factor-1 receptor</i>
Ctnnb1	<i>Cytoplasmic protein β -catenin</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition
FACS	<i>Fluorescense-Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
FOXC1	<i>Forkhead box C1</i>
FOXF1	<i>Forkehead box F1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICC-LCs	<i>Interstitial cell of Cajal-like cells</i>
IFN- γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IO	<i>Intact Opposite</i> , gesunde kontralaterale Niere
IVC	<i>Individually Ventilated Cages</i>
JAK	Januskinase, <i>Just Another Kinase</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2)
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MCU	Miktionszystourethrographie
MLKL	<i>Mixed-lineage kinase domain-like</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease

MMT	Makrophagen-Myofibroblasten-Transition
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR- β	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PLC- γ	<i>Phospholipase C-γ</i>
RAG	Recombination activation gene-1
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
Ras-MAPK	Rat sarcoma -mitogen-activated protein kinase
RBP	<i>Retinol Binding Protein</i>
RIPK3	<i>Receptor Interacting Protein Kinase 3</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SFU	<i>Society for Fetal Urology</i>
Smo	smoothed
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SYK	Spleen tyrosine kinase
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMP1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1</i>
TLR2	<i>Toll like receptor 2</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UPS	Ureteropelvine Stenose
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
v/v	Volumenprozent
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>

Zusammenfassung

Konnatale obstruktive Uropathien sind eine häufige Ursache chronischer Niereninsuffizienz im Kindesalter. Diese angeborenen Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege sind pathophysiologisch durch eine zytokinvermittelte Entzündungsreaktion in der Niere, eine Leukozyteninfiltration, tubuläre Atrophie und die Entwicklung renaler interstitieller Fibrose gekennzeichnet, was zum irreversiblen Verlust von Nephronen führt mit der Folge einer Niereninsuffizienz. Im Tiermodell der konnatalen obstruktiven Uropathie sind nach unilateraler Ureterligatur in der neonatalen Mausniere Makrophagen und T-Zellen histologisch nachweisbar. Basierend auf Zelloberflächenmarkern und Zytokinprofilen können verschiedene Makrophagenphänotypen unterschieden werden, die entweder pro-inflammatorisch oder profibrotisch (M2-Makrophagen) wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Leukozytensubpopulationen, sowie die renale Apoptose und Proliferation, die Entwicklung tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie zu untersuchen. Daher wurde bei neugeborenen Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) am 2. Lebenstag entweder eine unilaterale Ureterligatur (UUO) oder eine Schein-Operation (Sham) durchgeführt, bei der das Abdomen nur eröffnet, der Harnleiter aber nicht ligiert wird. Am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag wurden die Nieren entnommen und immunhistochemisch auf Leukozyten (T-Lymphozyten und M2-Makrophagen), Apoptose, Proliferation, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose untersucht. Mittels Western Blot wurde zusätzlich die Expression von Galectin-3, Caspase-8, α -SMA und PDGFR- β in der neonatalen Niere mit Ureterligatur bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die unilaterale Ureterligatur eine kontinuierliche und signifikante Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten in der Mausniere induziert. Parallel dazu nahm die Infiltration Galectin-3 positiver M2-Makrophagen in der neonatalen UUO-Niere zu. Die Proliferation renaler Tubuluszellen war nach Ureterligatur signifikant reduziert, während interstitielle Zellen (infiltrierende Leukozyten, Myofibroblasten und Fibroblasten) keine Zunahme der Proliferation zeigten. Die unilaterale Ureterligatur führte zur signifikanten Zunahme tubulärer Apoptose im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe. Die Entwicklung tubulärer Atrophie betraf hauptsächlich proximale Tubuli in der neonatalen Niere. Bezuglich der interstitiellen Fibrose war nach unilateraler Ureterligatur eine kontinuierliche Zunahme der Ablagerung kollagener Fasern in der neonatalen Mausniere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle nachweisbar. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Zunahme von α -SMA als Marker aktiver Myofibroblasten in der ureterligierten Niere im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von α -SMA, Galectin-3 und PDGFR- β in der ureterligierten Niere

war signifikant erhöht, während die Expression von Caspase-8 im zeitlichen Verlauf abnahm, was die Ergebnisse der immunhistochemischen und histochemischen Untersuchungen bestätigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie zu einer deutlichen Inflammationsreaktion mit Zunahme der Leukozyteninfiltration kommt. Die lokale Proliferation von Makrophagen und T-Zellen spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle, was darauf hindeutet, dass insbesondere die Rekrutierung der Immunzellen pathophysiologisch relevant ist. Darüber hinaus zeigte sich eine deutliche Zunahme tubulärer Apoptose mit der Folge tubulärer Atrophie besonders im proximalen Tubulus der neonatalen Niere, was zu atubulären Glomeruli und dem Verlust von Nephronen mit der Folge einer Niereninsuffizienz führt. Dabei spielt auch die zunehmende Vernarbung (interstitielle Fibrose) der Niere eine Rolle, die nach unilateraler Ureterligatur durch aktivierte Myofibroblasten ausgelöst wird.

Schlussfolgernd könnte möglicherweise eine selektive Blockade der Leukozytenrekrutierung und -infiltration in die neonatale Niere der Entwicklung interstitieller Fibrose und Niereninsuffizienz bei kongenitalen obstruktiven Uropathien vorbeugen. Möglicherweise könnten auch Zytokine, welche die Inflammation, den Zelltod und die interstitielle Fibrose in der neonatalen Niere vermitteln und mit dem Urin ausgeschieden werden, als Biomarker bei Patienten mit obstruktiven Uropathien diagnostisch von Nutzen sein.

1 Einleitung

1.1 Konnatale obstruktive Uropathie - klinische Bedeutung

1.1.1 Definition und Ätiologie

Konnatale obstruktive Uropathien gehören zu den häufigsten Ursachen einer chronisch terminalen Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter [5-7]. Definitionsgemäß liegt den konnatalen obstruktiven Uropathien eine Harnabflusstörung zugrunde, welche unbehandelt zu einer Störung der Nierenentwicklung mit bereits intrauteriner Nierenschädigung, einer reduzierten Nephronmasse und Nierenfunktionseinschränkung führt [1, 8-10]. Diese Harnabflusstörung entsteht durch eine Entwicklungsstörung des fetalen Harntraktes und umfasst sowohl echte Obstruktionen als auch funktionelle Abflusstörungen [5, 11].

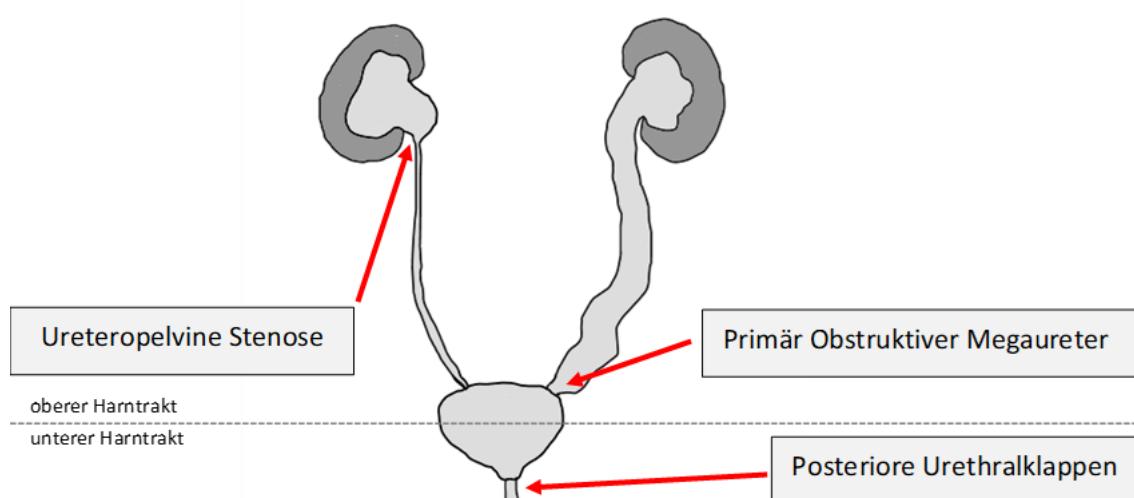


Abbildung 1: Häufige Formen der konnatalen obstruktiven Uropathien und ihre Lokalisation: oberer Harntrakt: ureteropelvine Stenose, primär obstruktiver Megaureter, unterer Harntrakt: posteriore Urethralklappen, modifiziert nach [3, 4]

Die Einteilung der konnatalen obstruktiven Uropathien erfolgt anhand der Lokalisation der Obstruktion (Abb.1).

Die häufigste Form stellt die ureteropelvine Stenose (UPS) dar, bei welcher eine Harnabflusstörung am Übergang des Nierenbeckens in den proximalen Ureter besteht [11]. Durch den resultierenden Harnstau entsteht eine Hydronephrose, die das Nierenbecken bis

hin zum Nierenbeckenkelchsystem erfassen und auch mit einer Nierenparenchymverschmälerung einhergehen kann. Der Ureter ist bei der UPS nicht erweitert [4-6, 11, 12]. Die Inzidenz der ureteropelvinen Stenose beträgt ca. 1:1000 - 1:1500 bei Neugeborenen, betrifft vermehrt die linke Niere im Verhältnis 2:1 und tritt bei Jungen häufiger als bei Mädchen (Verhältnis 2:1) auf [1, 4, 11]. Ein bilaterales Auftreten der UPS ist sehr selten [4, 11]. Die bei der UPS vorliegende Obstruktion kann ätiologisch in intrinsische und extrinsische Ursachen eingeteilt werden [11]. Zu den intrinsischen Ursachen zählen intramurale und murale, zu den extrinsischen Ursachen extramurale Ursachen [4]. Intramurale Ursachen sind sehr selten und beinhalten abnorme Klappen der Harnleitermukosa oder Polypen [4, 11]. Die häufigste Form der UPS (ca. 90%) stellen murale Obstruktionen dar, welche durch ein aperistaltisches oder dysfunktionales Harnleitersegment entstehen, dem ätiologisch eine Fehlverteilung glatter Muskelzellen, von Kollagen und / oder eine gestörte Harnleiterperistaltik zugrunde liegt [4, 11]. Die murale Form der UPS führt zu einer Abflussstörung des Harns, wobei das Ureterlumen an der Stenose i.d.R. noch offen aber stark eingeengt ist [4, 11]. Bei den sehr seltenen extrinsischen oder extramuralen Ursachen der UPS kommt es durch kreuzende oder aberrierende renale Gefäße, Adhäsionen oder Ligamente zur Einengung des pyeloureteralen Übergangs [4, 11]. UPS sind meist angeboren und kommen bei Neugeborenen und Säuglingen meist als murales aperistaltisches Segment, bei älteren Kindern und Jugendlichen als extramurale Engstelle durch äußere Kompression vor [11]. Sekundäre Formen, beispielsweise durch eine erworbene Obstruktion durch Narbenbildung am Übergang des Pyelons in den Ureter, sind sehr selten [11].

Wesentlich seltener tritt bei den konnatalen obstruktiven Uropathien eine Stenose im Bereich des ureterovesikalen Überganges auf, welche als primär obstruktiver Megaureter (POM) bezeichnet wird (Abb.1). Beim POM kommt es neben der Hydronephrose zu einer Dilatation des Harnleiters [13]. Der POM weist eine männliche Prädominanz (2-4x häufiger) auf und betrifft vorwiegend die linke Seite [4, 14]. Er ist meist unilateral, nur in ca. 25% der POM kommt es zu einem bilateralen Befund [1, 14, 15]. Verursacht wird der POM durch ein aperistaltisches oder dysfunktionales Harnleitersegment im Bereich des distalen Ureters. Ähnlich wie die UPS, ist der POM auch durch eine abnorme Verteilung von glatten Muskelzellen und Kollagen im Harnleiter verursacht, welche die Ureterperistaltik beeinträchtigen und eine Stenose hervorrufen [4, 14].

Die schwerwiegendste Form der konnatalen obstruktiven Uropathie stellen die posterioren Urethralklappen (UK) dar (Abb.1), welche nur bei Jungen mit einer Inzidenz von ca. 1:4000 bis 1:10.000 auftreten [1, 13, 16, 17]. Aufgrund der infravesikalen Obstruktion kommt es zu einer Megazystis mit verdickter Blasenwand und bilateralen Hydronephrose, häufig verbunden mit der Anlage dysplastischer Nieren und dem hohen Risiko einer terminalen Niereninsuffizienz im Kindes- oder jungen Erwachsenenalter [1, 4, 13, 16, 17]. Ätiologisch liegt bei der UK eine

segelartige Membran in der Harnröhre vor ausgehend vom Verumontanum, welche ventral in der Mittellinie der Urethra fusioniert [4, 18]. Bei Miktionsspannung spannt sich diese Membran auf und führt zur infravesikalen Obstruktion mit Harnabflusstörung [18].

1.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Diagnostisch zeigen sich die meisten Harntraktanomalien im Rahmen der pränatalen Ultraschalluntersuchungen im zweiten Trimenon (12. - 28. SSW) [19]. Hierbei findet sich eine uni- oder bilaterale Hydronephrose bei 2% bis 5% aller Schwangerschaften, die damit eine der häufigsten pränatal diagnostizierten Anomalien darstellt [4, 20, 21]. Eine klinische Relevanz liegt jedoch nur bei ca. 10-20% vor [1, 3, 4, 22-24], da sich in 80-90% diese pränatal entdeckten Befunde spontan normalisieren. Die häufigste pathologische Ursache einer pränatal diagnostizierten Hydronephrose ist in 10-30% der Fälle die ureteropelvine Stenose [11, 24, 25]. Seltener sind ein primär obstruktiver Megaureter (5-15%) oder posteriore Urethralklappen (1-5%) ursächlich [14, 24, 25]. Aufgrund der klinischen Relevanz und dem in dieser Arbeit verwendeten neonatalen Tiermodell der ureteropelvinen Stenose, wird im Folgenden auf die Diagnostik, Therapie und Prognose der UPS eingegangen.

Die Einteilung des Schweregrades der pränatalen sonographischen Dilatation des Nierenbeckensystems erfolgt anhand der Klassifikation der *Society for Fetal Urology* (SFU): bei Grad I zeigt sich lediglich eine Erweiterung des Nierenbeckens, bei Grad II eine Dilatation des Nierenbeckens und einiger, jedoch nicht aller Nierenkelche, bei Grad III eine Erweiterung des Nierenbeckens und aller Nierenkelche und bei Grad IV tritt zudem noch eine Parenchymverschmälerung auf [1, 4, 24]. Die Messung des anterior-posterioren Nierenbeckendurchmessers gilt als zusätzliches diagnostisches Kriterium zur Einschätzung des Schweregrades; ein Durchmesser >4mm im zweiten Trimenon oder >7mm im dritten Trimenon gelten als abnormal [1, 26]. Zur Risikostratifizierung für das postnatale Management erfolgt bei pränatal diagnostizierten Hydronephrosen zudem eine Mitbeurteilung von Harnleiter, Harnblase und Blasenwand sowie eine Abschätzung der Fruchtwassermenge [11, 24, 25].

Bei intrauterinen Auffälligkeiten werden nach Geburt sonographische Kontrolluntersuchungen der Nieren in der Regel ab dem 3. bis 4. Lebenstag durchgeführt, da hier mit einem Abklingen der physiologischen Oligurie gerechnet werden kann. Eine weitere Verlaufskontrolle erfolgt vier bis sechs Wochen später [1, 4, 24]. Bei reifgeborenen Neonaten gilt ein anterior-posteriorer Nierenbeckendurchmesser (APD) von <7mm als normal, ein APD von 10-15mm gilt als moderat erhöht, und ein APD >15mm wird als hochgradige Hydronephrose bezeichnet [4, 26, 27]. Zudem erfolgen eine sonographische Einschätzung der Nierenkelcherweiterung,

der Parenchymverschmälerung und von Dysplasiezeichen anhand einer standardisierten Gradeinteilung der Hydronephrose (Abb. 2) [1, 2, 4]. Wichtig ist zudem die Beurteilung der kontralateralen Niere, da eine kontralaterale Hypertrophie als Hinweis für eine Funktionseinschränkung der betroffenen Niere gewertet werden kann [4]. Bei uneindeutigen Befunden in der postnatalen Sonographie werden engmaschige serielle Verlaufskontrollen empfohlen, um eine nur intermittierend symptomatische UPS zu demaskieren [11].

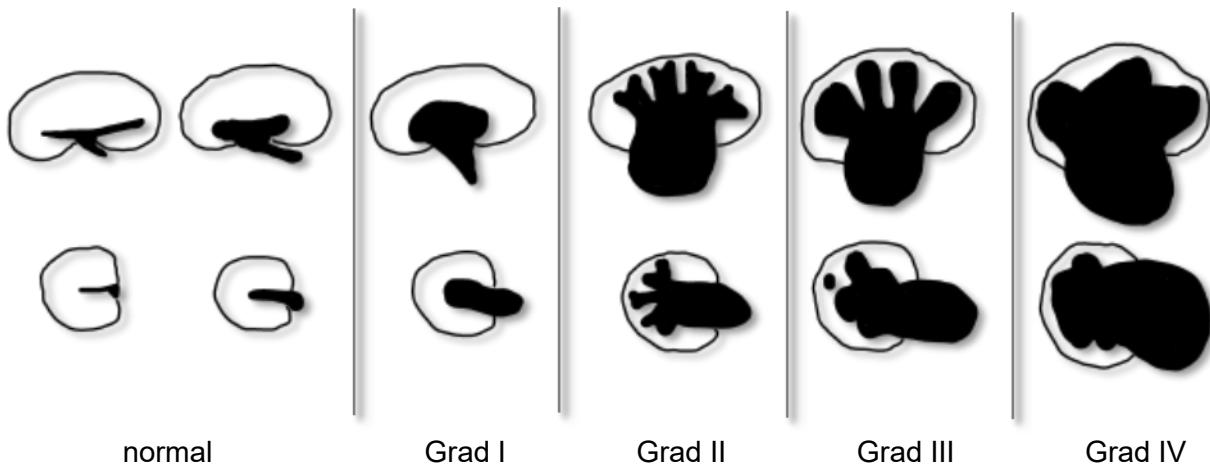


Abbildung 2: Schematische Darstellung der sonographischen Gradeinteilung der Hydronephrose, modifiziert nach [1, 2]

Bei persistierenden Hydronephrosen, bei hochgradiger Ausprägung, bilateralen Auffälligkeiten oder einer Einzelniere mit UPS-Verdacht ist eine rasche Diagnostik und Therapieeinleitung notwendig, um die Nierenfunktion bestmöglich zu erhalten [4, 20, 28]. Klinische Symptome einer UPS bei Kindern können abdominelle Schmerzen, Übelkeit und rezidivierendes Erbrechen, Harnwegsinfektionen oder eine Hämaturie sein [4]. Eine dekompensierte UPS kann sich in kolikartigen abdominellen Schmerzen äußern. Selten ist zusätzlich eine Urolithiasis nachweisbar, die dann eine metabolische Diagnostik erforderlich macht, um eine Hyperkalziurie, Hyperoxalurie oder Hypocitraturie auszuschließen [11].

Zur weiterführenden Diagnostik wird bei Verdacht auf UPS ab der 4. bis 6. Lebenswoche eine dynamische ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycin-Szintigraphie (MAG-3) zur Beurteilung der seitengrenzen Nierenpartialfunktion und des Abflussmusters durchgeführt, um zwischen einer obstruktiven oder nicht-obstruktiven Harntransportstörungen zu unterscheiden [4, 11, 29, 30].

Des Weiteren steht mit der kontrastmittelgestützten Magnetresonanzurographie (MR-Urogramm) ein diagnostisches Verfahren zur Verfügung, welches funktionelle und

morphologische Informationen liefern kann [1, 2, 4]. Zur quantitativen Messung der Nierenfunktion und zur anatomischen Beurteilung erfolgen nach intravenöser Verabreichung von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel serielle Aufnahmen der Nieren und ableitenden Harnwege, wodurch die Nierenpartialfunktion und die Ausscheidung kalkuliert werden können [11]. Aufgrund der langen Untersuchungszeit mit notwendiger Analgosedierung oder Narkose und der kontraindizierten Applikation von Gadolinium-haltigem Kontrastmittel bei Kindern mit Nierenfunktionseinschränkung, wird diese Untersuchungsmethode jedoch nur sehr selten und bei speziellen Fragestellungen wie komplexen Fehlbildungen empfohlen [11].

Die Therapie der UPS zielt darauf ab, die Nierenfunktion bestmöglich zu erhalten, bzw. eine Abnahme oder einen Verlust an Nierenfunktion zu verhindern [2]. Wichtig ist hierbei eine enge interdisziplinäre Kooperation zwischen pädiatrischen Nephrologen und Urologen unter Miteinbezug der Eltern. Aufgrund der großen Anzahl an asymptomatischen, pränatal diagnostizierten Kindern mit UPS, bei welchen sich im Verlauf stabile oder regrediente Befunde zeigen, ist die Entscheidung zwischen konservativer oder operativer Therapie nicht immer einfach zu treffen [4]. Bei Säuglingen mit mäßiggradiger bis moderater Hydronephrose (Grad I bis Grad II nach SFU) ist häufig keine operative Korrektur erforderlich; bei ihnen erfolgen dann regelmäßig bildgebende und ggf. nuklearmedizinische Verlaufskontrollen [11, 28]. In die Entscheidung zur operativen Korrektur fließen u.a. der Hydronephrose-Grad, eine bereits vorhandene Nierenfunktionseinschränkung, die seitengetrennte Nierenpartialfunktion und ihre Abnahme im Verlauf, sowie das Auftreten von Harnwegsinfektionen ein [1, 2, 28]. Eine operative Korrektur ist aktuell in ca. 30-40% der UPS-Fälle notwendig [1, 3, 4]. Risikofaktoren für die Notwendigkeit einer operativen Korrektur sind eine hochgradige Hydronephrose (Grad III bis Grad IV nach SFU) und eine eingeschränkte Nierenpartialfunktion <40% [11, 31]. Eine klare Evidenz für bestimmte Grenzwerte, welche ein primär operatives Verfahren indizieren, liegt aktuell jedoch nicht vor [11]. Die publizierten Grenzwerte der Nierenpartialfunktion mit Indikation zur operativen Therapie variieren zwischen <35% bis <45% [11, 32]. Das operative Standardverfahren zur Korrektur der UPS ist im Säuglingsalter die offene Pyeloplastik nach Anderson-Hynes, bei der die Stenose reseziert und der Ureter an das Nierenbecken re-anastomosiert wird [1, 32]. Hierbei wird eine möglichst restriktive Resektion empfohlen, um für die Peristaltik relevante glatte Muskelzellen und interstitielle Cajal-Zellen am Übergang von Nierenbecken und Ureter möglichst vollständig zu erhalten [11]. Supportiv erfolgt meist eine transanastomotische Schienung und eine Harndrainage durch Pyelostomie oder Nephrostomie [11, 32]. Zunehmend etablieren sich auch laparoskopische und robotisch-assistierte Verfahren, wobei das perioperative Outcome je nach Zentrum sehr variabel ist [1, 4, 32, 33]. In kinderurologischen Zentren mit hohen Fallzahlen können jedoch äquivalente Ergebnisse zu offenen Verfahren erzielt werden [32].

Sowohl bei konservativ behandelten als auch bei operativ korrigierten UPS-Patienten sind regelmäßige Verlaufskontrollen notwendig, um eine persistierende oder progrediente Harnabflusstörung, eine Nierenfunktionseinschränkung, eine Proteinurie oder arterielle Hypertonie zu erkennen und rechtzeitig zu therapieren. Auch wenn bisher verlässliche Langzeitstudien fehlen, scheint das Outcome für die meisten UPS-Patienten gut zu sein [4]. Kritisch anzumerken ist, dass sich auch bei Kindern nach operativ korrigierter UPS persistierende Nierenpartialfunktionseinschränkungen zeigten, insbesondere, wenn diese bereits präoperativ sehr ausgeprägt waren [11, 34]. Darüber hinaus zeigen Metaanalysen von UPS-Patienten, dass bei ca. 20% der primär konservativ behandelten Kinder im Verlauf eine Abnahme der seitengetrennten Nierenpartialfunktion auftritt, und in 28% der Fälle bei den initial konservativ therapierten UPS-Patienten doch noch eine sekundäre Operation erforderlich war, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die aktuellen diagnostischen Kriterien zur Therapieentscheidung nicht ausreichen [35] und tendenziell zu wenige UPS-Patienten primär operiert werden. Auch eine Langzeitbeobachtung der UPS-Patienten mit ggf. einer Transition zur adäquaten Nachsorge im Erwachsenenalter erscheint vor diesem Hintergrund sinnvoll.

1.1.3 Biomarker

Die Etablierung von Biomarkern im Urin ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Diese Marker könnten die Entscheidung der OP-Bedürftigkeit bei Patienten mit UPS erleichtern. So wurden bereits in kleinen, i.d.R. monozentrischen Analysen verschiedene Biomarker wie z. B. NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*), RBP (*Retinol Binding Protein*), TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*), KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*), β -Catenin, Vimentin, Aquaporin-2 und E-Cadherin im Urin von Kindern mit UPS untersucht [32, 36-38]. Bislang konnten jedoch bei noch unzureichender Sensitivität und Spezifität der Biomarker keine eindeutigen Aussagen zum Obstruktionsgrad der UPS getroffen werden [39]. Erschwerend kommt hinzu, dass erstens in diesen publizierten Studien in der Regel UPS-Kinder im Durchschnittsalter von >2 Jahren untersucht wurden und keine Säuglinge. Zweitens wurde die Biomarkerausscheidung i.d.R. verglichen zwischen operierten UPS-Kindern und gesunden Kontrollen und nicht zwischen operierten UPS-Kindern und konservativ therapierten UPS-Patienten und drittens lagen die Fallzahlen durchschnittlich bei unter 25 UPS-Patienten und ermöglichen somit kaum eine Aussage. Analysen des Urinproteoms, genauer des Urinpeptidoms konnten allerdings in einer kleineren Kohorte Unterschiede zwischen konservativ behandelten und operierten Kindern mit UPS nachweisen, die jedoch später an einer größeren Kohorte nicht mehr validiert werden konnten [40-42]. Zusätzlich zeigte eine Langzeituntersuchung 4 Jahre nach Therapie der UPS Veränderungen des Urinproteoms in

der konservativen UPS-Gruppe im Vergleich zu den operierten UPS-Kindern, was auf länger andauernde Umbauprozesse des Nierenparenchyms in der konservativen Gruppe hindeutet und auf eine unzureichende Therapie [42]. Eine Anwendung von Urinbiomarkern ist bis heute in der klinischen Diagnostik noch nicht angekommen. Weitere prospektive Biomarker-Studien bei Säuglingen mit UPS sind notwendig, um die Prognose von Kindern mit UPS zu verbessern und Nephronmasse langfristig zu erhalten [3].

1.2 Pathogenese der konnatalen obstruktiven Uropathie

1.2.1 Die physiologische Nieren - und Harnleiterentwicklung

Das Urogenitalsystem beim Menschen entwickelt sich aus dem intermediären Mesoderm [43]. Während der embryonalen Entwicklung der Niere entstehen hieraus die Vorniere (Pronephros), Urniere (Mesonephros) und die Nachniere (Metanephros) [43]. Pronephros und Mesonephros sind nur zum Teil funktionstüchtig und bilden sich im Verlauf wieder zurück [43, 44]. Das Metanephros besteht aus dem metanephrogenen Mesenchym, in welches die Ureterknospe aus dem kaudalen Anteil des Wolffschen-Gang einsprießt [43, 45]. Dies geschieht ungefähr ab der 4. Schwangerschaftswoche (SSW) [45]. Durch die sogenannte „reziproke Interaktion“ zwischen Ureterknospe und metanephrogenem Mesenchym verzweigt sich die Ureterknospe im metanephrogenen Mesenchym und induziert die Glomerulogenese [45]. Die Ureterknospe verzweigt sich hierbei in 15-20 Generationen vermehrt an den Polregionen, wodurch die bohnenartige Formung der Niere entsteht [44]. Relevant für den durch die reziproke Interaktion gesteuerten Verzweigungsprozess ist das vom metanephrogenen Mesenchym sezernierte Protein GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) [44]. Aus dem metanephrogenen Mesenchym entwickeln sich durch mesenchymale-epitheliale Transformation die Nephronen, welche ab der ca. 11. SSW Urin produzieren. Hierbei kommt es nach mesenchymaler Kondensation zur Bildung von epithelialen Nierenbläschen, welche sich über ein S-förmiges Stadium zu Tubuli und Glomeruli entwickeln [44]. Während dieser Nephrogenese, welche ca. in der 4. SSW beginnt und zwischen der 34. SSW und 36. SSW intrauterin abgeschlossen ist, bilden sich bis zu 2 Millionen Nephronen pro Niere aus [4, 45-47]. Die Anzahl an Nephronen variiert bei Geburt stark und korreliert mit dem Geburtsgewicht [46].

Die Harnleiterentwicklung findet parallel zur Nierenentwicklung statt. Ungefähr zeitgleich mit dem Beginn der Urinproduktion um die 10. bis 11. SSW bildet sich aus dem distalen Anteil der Ureterknospe durch Verlängerung der Harnleiter, welcher als muskulärer Schlauch den Urin

transportiert [4, 44, 48]. In der frühen Entwicklung um die 6. SSW kommt es dabei zu einer physiologischen temporären Obliteration und folgenden Rekanalisation des Ureters [16, 44, 49]. Die Entwicklung des Ureters erfordert ähnlich wie die Nierenentwicklung, eine enge Interaktion zwischen den inneren epithelialen ureteralen Zellen und den umgebenden mesenchymalen Zellen der Harnleiterwand [4]. Ein relevantes Protein für die physiologische Elongation des Ureters ist das mesenchymal sezernierte BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), das durch Hemmung von GDNF die Differenzierung und Proliferation des Harnleiterepithels beeinflusst [44, 50]. Das vielschichtige Urothel des Harnleiters entwickelt sich aus frühen kuboidalen ureteralen Epithelzellen und ist apikal von Plaques bedeckt, welche durch die Expressierung von speziellen Transmembranproteinen, den Uroplakininen, die Urinimpermeabilität und Stabilität sicherstellen [4, 51, 52]. Die mesenchymalen Zellen differenzieren zu Stromazellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten und bilden als äußere Harnleiterwandschichten die spätere Serosa [4, 11, 45]. Die glatten Muskelzellen des Ureters differenzieren sich in einer inneren zirkulären und äußeren longitudinalen Schicht ausgehend vom distalen Bereich des Ureters in aufsteigender Richtung und somit in entgegengesetzter Richtung zur Ureterperistaltik [4, 53]. Die ureterale Peristaltik wird durch Schrittmacherzellen im Bereich der proximalen Nierenkelche, im proximalen Nierenbecken und dem Ureter gesteuert. Diese Schrittmacherzellen erzeugen pulsatile elektrische Signale, welche über die elektrisch aktiven „typischen“ glatten Muskelzellen weitergeleitet werden [4, 54, 55]. Bislang wurden zwei Arten von Schrittmacherzellen identifiziert. Die sogenannten „atypischen“ glatten Muskelzellen sind im Nierenbecken lokalisiert, exprimieren u.a. T-Typ-Kalziumkanäle und haben morphologische Ähnlichkeiten zu kardialen sinuatrialen Schrittmacherzellen [4, 11]. Daneben existieren sogenannte interstitielle Zellen des Cajal-Typs (ICC-LCs, *interstitial cell of Cajal-like cells*), welche v.a. im proximalen Harnleiter lokalisiert sind, durch die Expression der Tyrosinkinase cKIT charakterisiert sind und interstitiellen Cajal-Zellen ähneln [4, 11]. Der genaue molekulare Mechanismus der Reizbildung und Reizleitung im Nierenbecken und im Harnleiter ist bislang noch nicht geklärt [45, 56]. Es wird angenommen, dass atypische glatte Muskelzellen als primäre Schrittmacher spontane Potentiale initiieren, welche dann von den interstitiellen Zellen des Cajal-Typs modifiziert und an die benachbarten typischen glatten Muskelzellen weitergeleitet werden und so die Harnleiter-Peristaltik auslösen [4]. Die interstitiellen Zellen des Cajal-Typs können zudem vermutlich eine zusätzliche sekundäre Schrittmacherfunktion übernehmen, wenn die primäre Schrittmacherfunktion fehlt [4, 54, 55].

Das komplexe Zusammenspiel in der embryonalen Entwicklung von Niere und Harntrakt, die Differenzierung von Urothelzellen, glatten Muskelzellen, Reizbildungssystem und ableitendem Harnsystem bietet viele Möglichkeiten von Entwicklungsstörungen, welche ursächlich für die Entstehung einer UPS sein können.

1.2.2 Pathogenese

Die Pathogenese der kongenitalen obstruktiven Uropathien ist nach heutigem Erkenntnisstand multifaktoriell und beinhaltet sowohl exogene als auch endogene Faktoren [47].

Zu den exogenen Faktoren zählen teratogene Substanzen, die die renale Entwicklung beeinflussen [47, 57]. Hierzu zählt die mütterliche Einnahme von Kortikosteroiden, ACE-Hemmern, nicht-steroidalen Antirheumatika, Alkohol und Kokain, wobei epidemiologisch eine klare Assoziation umstritten ist [47, 57-59]. Zu den endogenen Faktoren gehören sowohl Störungen in der embryonalen Entwicklung des Urogenitalsystems als auch genetische Mutationen, die eine UPS verursachen können. Allerdings wurde bis heute noch keine monogenetische Ursache einer UPS identifiziert, sondern nur genetische Varianten beschrieben, die syndromale Erkrankungen mit UPS hervorrufen.

Tierexperimentell wurden mehrere genetische Mutationen identifiziert, die an der Entstehung einer UPS beteiligt sein können. So konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass Mutationen in Genen, die an der Entwicklung der glatten Muskelzellen des Ureters und der Entwicklung von ureteralen Schrittmacherzellen beteiligt sind, mit einer Hydronephrose assoziiert sind. Diese Gene betreffen den *Sonic hedgehog*-Signalweg (z.B. *Smo (smoothened)* und *Gli3*) [60], den *TGF-β*-Signalweg (*transforming growth factor*) (z.B. *BMP4 (bone morphogenetic protein 4)*) [50] und den *wnt*-Signalweg (z.B. *Ctnnb1 (cytoplasmic protein β -catenin)*) [61]. Zudem wurden Mutationen im Renin-Angiotensin-System, z.B. im Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1-Rezeptor) und Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT₂-Rezeptor) im Zusammenhang mit Harntraktanomalien identifiziert [4, 45, 47, 62].

Sehr selten treten angeborene UPS auch im Rahmen einer syndromalen Erkrankung oder eines Fehlbildungssyndrom (z.B. VACTERL-Assoziation, anorektale Malformationen, Ösophagusatresie, kardiale Fehlbildungen) auf [4, 11, 16, 63]. So konnten Weisschuh et al. bei Patienten mit Axenfeld-Rieger-Syndrom einen Phänotyp mit UPS beschreiben [64]. Das Axenfeld-Rieger-Syndrom ist durch eine Mutation im *FOXC1*-Gen (*forkhead box C1*), einem Transkriptionsfaktor, der im metanephrogenen Mesenchym exprimiert wird, verursacht [45]. Zudem können Mutation im *FOXF1*-Gen (*forkhead box F1*) das sogenannte „*Alveolar Capillary Dysplasia with Misalignment of Pulmonary Veins*“-Syndrom verursachen, welches neben den Lungenveränderungen zusätzlich Strikturen am ureteropelvinen Übergang mit einer Hydronephrose aufweist [64, 65]. *FOXC1* und *FOXF1* sind bislang die einzigen Gene, die mit einer syndromalen UPS beim Menschen assoziiert sind [45].

Störungen, die während der embryonalen Entwicklung auftreten und zu angeborenen Anomalien der Nieren und/ oder ableitenden Harnwege führen, werden unter dem Begriff *Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract* (CAKUT) zusammengefasst [66].

Mittels *Whole-exome-sequencing* können heute bei ca. 12-14% der Patienten mit angeborenen Nieren- und Harntraktanomalien monogenetische Ursachen nachgewiesen werden, wobei aktuell über 50 Mutationen bekannt sind [67]. Für die isolierte, nicht im Rahmen von syndromalen Erkrankungen auftretende UPS konnte bislang noch keine monogenetische Ursache identifiziert werden [11]. Die meisten CAKUT-Mutationen treten sporadisch als *de novo*-Mutationen auf; nur bei sehr wenigen Patienten liegt eine positive Familienanamnese vor [63].

1.3 Neonatales Tiermodell der obstruktiven Uropathie

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Veränderungen bei kongenitalen obstruktiven Uropathien haben sich chirurgische Tiermodelle an Mäusen und Ratten mit partieller oder kompletter Ureterligatur etabliert [6, 68-70]. Durch die chirurgische Harnleiterligatur können je nach Fragestellung verschiedene Modelle mit variablem Zeitpunkt, Schweregrad und Dauer der Obstruktion kreiert werden [6, 68]. Die Folgen einer Ureterobstruktion in der reifen Niere adulter Tiere unterscheiden sich jedoch gravierend von denen in der sich entwickelnden Niere, sowohl bei der Maus als auch beim Patienten. Da die Nephrogenese beim Menschen intrauterin abgeschlossen wird, interferieren obstruktive Uropathien wie die UPS mit der Nephrogenese [6]. Aus diesem Grund entwickelte Chevalier et al. das Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) bei neonatalen Mäusen und Ratten, bei welchen am zweiten Lebenstag eine komplette unilaterale Ureterligatur durchgeführt wird [71]. Die Nephrogenese bei Mäusen und Ratten wird nämlich anders als beim Menschen erst postnatal nach ca. 2 Wochen abgeschlossen, und bei Geburt liegen nur ca. 10% der Nephrone vor. Daher interferiert die Ureterligatur am 2.LT mit der vulnerablen Phase der Nierenentwicklung in der Maus und stört die Nephrogenese in einem ähnlichen Stadium, wie eine kongenitale UPS intrauterin die Nierenentwicklung beim Patienten beeinträchtigt [6] (Abb. 3). Die Vergleichbarkeit der pathophysiologischen UPS-Veränderungen beim Patienten und in der neonatalen Mausniere wurde durch die gleichen histologischen Veränderungen in Nierenbiopsien von UPS-Patienten und in der Mausniere mit Ureterligatur bestätigt. Auch Biomarker wurden bei Maus und Mensch identisch nachgewiesen. [72, 73].

Da sich die UPS klinisch bei Patienten eher als partielle und nicht komplett Obstruktion des Harnleiters präsentiert, wurden auch Tiermodelle einer partiellen Ureterligatur bei Mäusen und Ratten entwickelt [6, 68, 74, 75]. Diese sind an neonatalen Tieren jedoch aufgrund der kleinen anatomischen Verhältnisse technisch äußerst anspruchsvoll und ihrem Obstruktionsgrad sehr

variabel, sodass in dieser Arbeit das Modell der kompletten Ureterligatur (unilaterale Ureterobstruktion, UUO) an neonatalen Mäusen verwendet wird.

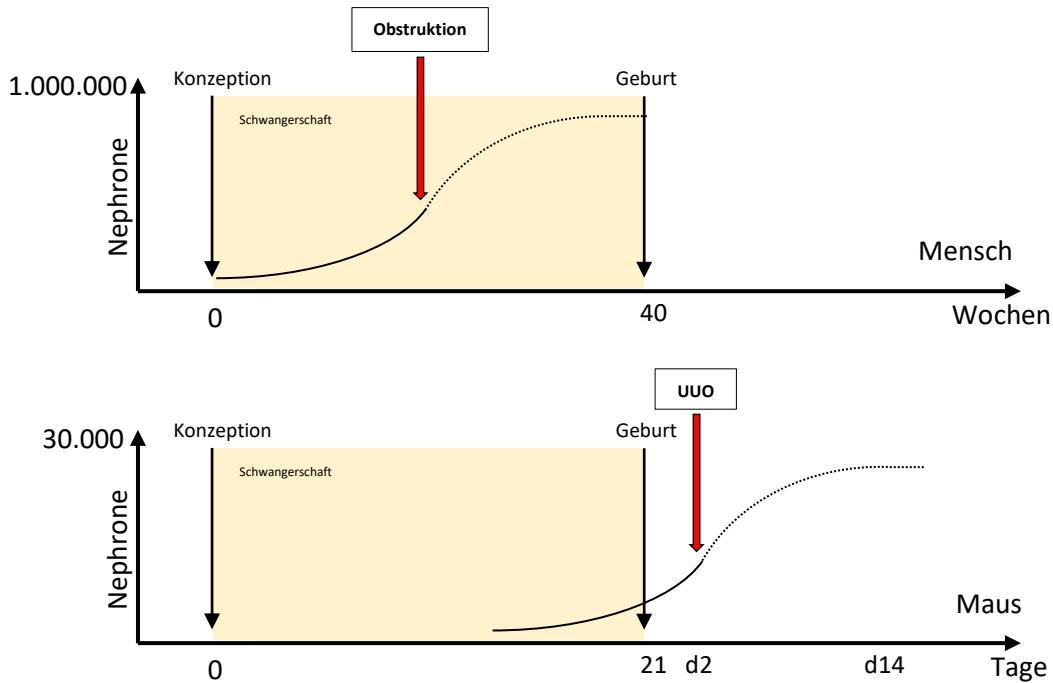


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Nephrogenese und Obstruktion bei UPS beim Menschen (oben) bzw. UUO bei der Maus (unten). Die Obstruktion tritt im gleichen Zeitraum der Nephrogenese auf.

1.4 Pathophysiologische Veränderungen nach unilateraler Ureterligatur (UUO)

Nach unilateraler Ureterligatur (UUO) kommt es initial durch die prästenotische hydrostatische Druckerhöhung zur mechanischen Dilatation von zunächst Sammelrohren, distalen und schließlich proximalen Tubuli. Diese mechanische Dilatation führt durch Vasokonstriktion zur Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und zu einer mechanischen Schädigung von Epithelzellen durch vermehrte Apoptose, Nekrose und zur Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) [5, 7, 76]. Die durch die Tubulusschädigung resultierende Reduktion des renalen Blutflusses führt zum peritubulären Kapillarverlust und durch die verminderte Perfusion zu Ischämie und Hypoxie [5, 76]. Der tubuläre Zelluntergang, bzw. -umbau führt zu tubulärer Atrophie mit atubulären Glomeruli, wodurch ein progreddienter Funktionsverlust der Nephrone und somit eine Nierenfunktionseinschränkung entsteht [5, 7, 75-77].

Unsere Arbeitsgruppe konnte in den letzten Jahren zeigen, dass die Inflammation in der UUO-Niere eine große Rolle spielt. So werden nach unilateraler Ureterligatur in der Niere Zytokine

und Chemokine (z.B. CCL2/MCP-1) ausgeschüttet und Adhäsionsmoleküle (z.B. Selektine, ICAM-1, VCAM-1, RAGE) hochreguliert, die zur Rekrutierung und Transmigration von Leukozyten ins Gewebe führen [5, 6, 78-82]. Bei diesen Leukozyten handelt es sich u.a. um aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen, welche pro-inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine, Sauerstoffradikale sowie Chemokine freisetzen und Chemokin-Rezeptoren (z.B. CCR5, CCR1) exprimieren [4]. Dies führt zu einer auto- und parakrinen Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und in der Folge zu einer chronischen Entzündungsreaktion, welche Einfluss auf die interstitielle Fibrose und Apoptose in der Niere hat [4, 7, 78]. Die Entwicklung der interstitiellen Fibrose nach unilateraler Ureterligatur ist hierbei auch von aktivierte Myofibroblasten abhängig, welche für die Synthese und Ablagerung extrazellulärer Matrix verantwortlich sind [78, 83]. Diese Myofibroblasten entstehen entweder durch Proliferation oder differenzieren lokal aus Fibroblasten oder mesenchymalen, epithelialen und endothelialen Zellen und Perizyten [68, 78, 84, 85].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der klinischen Relevanz der ureteropelvinen Stenose stellen sich, im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Pathophysiologie und zur Entwicklung möglicher Therapieansätze, folgende Fragen:

- Welche inflammatorischen Zellen spielen im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie eine Rolle, und in welchen renalen Kompartimenten sind diese Immunzellen nachweisbar?
- Kommt es vorwiegend zur Rekrutierung oder zur lokalen Proliferation von Immunzellen?
- Sind Galectin-3-positive M2-Makrophagen in der neonatalen Niere mit UUO nachweisbar?
- Wie entwickeln sich Apoptose, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose im zeitlichen Verlauf nach unilateraler Ureterligatur im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Tierart

Neugeborene Wildtypmäuse des Stammes Charles River 57/Black6 (C57BL/6-J) (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) wurden als Versuchstiere verwendet. In der Studie wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere untersucht.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung und Durchführung der Tierversuche

Das hier vorgestellte tierexperimentelle Projekt wurde nach Genehmigung des Regierungspräsidiums Oberbayern durchgeführt (Aktenzeichen 55.2-1-54-25232-118-11).

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte in der Einrichtung der Zentralen Versuchstierhaltung in der Innenstadt München

Die Tierhaltung der neugeborenen Mäuse erfolgte zusammen mit dem Muttertier in IVC-Käfigen mit einer Nutzfläche von 530 cm² (blueline Typ II long; Tecniplast, Hohenpeißenberg). Als Einstreumaterial wurde rindenfreies Fichtenholz (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) verwendet, welches wöchentlich gewechselt wurde. Ausgestattet war der Käfig zudem mit zusätzlichem Nistmaterial (Nestletts, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), einem roten Häuschen (EBECO) und Nagematerial aus Weichholzstücken (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Muttertiere wurden mit autoklaviertem Alleinfutter V1534-300 ssniff R/M-H (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) ernährt. Die Zusammensetzung der Alleindiät bestand aus 19 % Rohprotein, 6,4 % Rohasche, 4,9 % Rohfaser, 3,3 % Rohfett, balancierten Mengen an Calcium, Phosphor, Natrium, den Vitaminen A, C, D3, E sowie Kupfersulfat. Zudem stand den Tieren zum Trinken autoklaviertes Leitungswasser uneingeschränkt zur Verfügung. Die neugeborenen Mäuse wurden über den gesamten Zeitraum vom Muttertier gestillt. Die Raumtemperatur der Versuchseinheit betrug 20-22°C, und die Zu- bzw. Abluft wurde über eine High-Efficiency Particulate Air/Arrestance (HEPA)-Schwebstofffiltereinheit gefiltert. Ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde über 12 Stunden Beleuchtung, bzw. 12 Stunden Dunkelheit gewährleistet.

2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik

2.2.1 Unilaterale Ureterligatur

Die unilaterale Ureterligatur wurde in neonatalen Mäusen jeweils am 2. Lebenstag mikrochirurgisch durchgeführt. Die Tiere erhielten eine Inhalationsnarkose mit einem Isoflurane (3-5% v/v) (Florene®; Abbott, Wiesbaden) -Sauerstoff - Gemisch, das über eine Narkoseapparatur (Völker GmbH, Kaltenkirchen) direkt über die Schnauze zugeführt wurde. Die Narkoseschlauchöffnung wurde dabei zur Verkleinerung mit einem kreuzweise eingeschnittenen Fingerling überzogen. Zusätzlich erhielten die neonatalen Mäuse eine i.p. Injektion von Fentanyl 0,05 mg/kg. Unter sterilen Bedingungen wurde das Abdomen der narkotisierten Tiere mit einer linksseitigen lateralen Laparotomie unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000-C; Zeiss, Göttingen) eröffnet. Nach atraumatischer Präparation und Darstellung des linken Ureters wurde dieser im proximalen Bereich an zwei Stellen vollständig mit einem 8-0 Seidenfaden (Perma-Hand*Seide, 8,0 mm; Ethicon, St-Stevens-Woluwe, Belgien) ligiert. Nach Säuberung des Operationssitus wurde das Abdomen mit einer Naht (fortlaufend) verschlossen. Die Tiere wurden nach Narkoseausleitung im Wachzustand zurück zu den Muttertieren in den Käfig gebracht und der Gesundheitszustand der Tiere regelmäßig kontrolliert.

2.2.2 Scheinoperation

Die neonatalen Mäuse der Kontrollgruppe erhielten am zweiten Lebenstag eine Scheinoperation. Unter den gleichen standardisierten Bedingungen wurde eine Inhalationsnarkose mit Isoflurane/ Sauerstoff (s.o.) eingeleitet und eine rechtsseitige laterale Laparotomie zur Eröffnung des Abdomens durchgeführt. Der rechte Ureter wurde dargestellt und anschließend das Abdomen mit einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen. Nach Narkoseausleitung wurden die Tiere zurück zu den Muttertieren in den Käfig gegeben.

2.3 Organentnahme

Postoperativ erfolgte die Entnahme der Nieren am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag. Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, das Abdomen durch eine mediale Laparotomie eröffnet und die Organe unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000-C; Zeiss, Göttingen) entnommen. Nach Abtrennen von Gefäßen und Ureteren wurden die Organe

dekapsuliert und gewogen. Zur Fixierung wurden die in Organkassetten (Sanova, Wien) gelegten Nieren für die histomorphologischen Untersuchungen für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (pH6,9, Merck, Darmstadt) fixiert. Die anschließende Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in 70% Ethanol (Merck, Darmstadt). Die Organe für die Western Blots wurden nach der Dekapsulierung bei -80°C eingefroren.

Es wurden drei Gruppen von Nieren zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen:

- ureterobstruierte Nieren (UUO, *unilateral ureteral obstruction*),
- gesunde kontralaterale Nieren (IO, *intact opposite*)
- und Nieren scheinoperierter Tiere (*Sham*).

2.4. Studienprotokoll

2.4.1 Studienprotokoll - Experimentalgruppe und Kontrollgruppe

Um die Leukozytensubpopulationen und tubulointerstitiellen Veränderungen nach unilateraler Ureterligatur zu untersuchen, wurden eine Experimental- und eine Kontrollgruppe gebildet. Die Experimentalgruppe setzte sich aus neonatalen Mäusen zusammen, bei welchen jeweils am zweiten Lebenstag die unilaterale Ureterligatur durchgeführt wurde. Zur Untersuchung der pathophysiologischen Veränderungen der obstruktiven Uropathie im zeitlichen Verlauf wurden vier Zeitpunkte zur Entnahme der Nieren gewählt, der 3., 7., 14. und 21. Lebenstag der Tiere. Dies entspricht dem 1., 5., 12. und 19. postoperativen Tag. Zu jedem Zeitpunkt wurden n=11 Nieren in jeder Gruppe entnommen.

In der Experimentalgruppe standen somit je neugeborener Maus die ureterligierte Niere (UUO; *unilateral ureteral obstruction*) und die intakte Niere der Gegenseite (IO; *intact opposite*) zur Untersuchung zur Verfügung (n=11 pro Gruppe und Zeitpunkt).

Die Kontrollgruppe bestand aus am zweiten Lebenstag scheinoperierten neonatalen Mäusen, deren Nieren (Sham) ebenfalls am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag (entspricht dem 1., 5., 12. und 19. postoperativen Tag) entnommen wurden (n=11 pro Gruppe und Zeitpunkt).

Eine Übersicht über Geburt, Operation und Organentnahme wird in Abbildung 4 dargestellt.

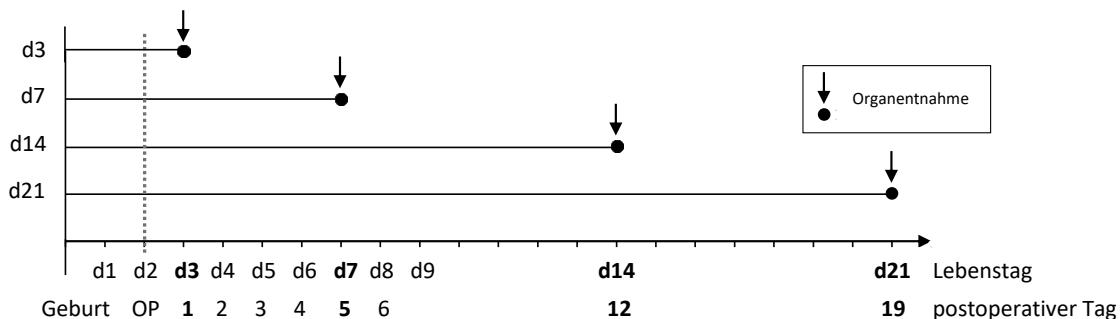


Abbildung 4: Schematische Übersichtsdarstellung über Geburt, Operation und Organentnahme

An den entnommenen, dekapsulierten und fixierten Nieren wurden immunhistochemische und histochemische Untersuchungen und Western Blots durchgeführt.

Die Gruppeneinteilung für die immunhistochemischen und histochemischen Untersuchungen und Western Blots ist in der folgenden Tabelle (Tabelle 1) detailliert dargestellt.

	Experimentalgruppe n = 44 UUO/ IO	Kontrollgruppe n = 44 Sham
3. Lebenstag (d3)	n = 11	n = 11
7. Lebenstag (d7)	n = 11	n = 11
14. Lebenstag (d14)	n = 11	n = 11
21. Lebenstag (d21)	n = 11	n = 11

Tabelle 1: Gruppeneinteilung für immunhistochemische und histochemische Untersuchungen und Western Blots

2.5. Histomorphologische und immunhistochemische Methoden

2.5.1 Paraffineinbettung der Nieren und Anfertigung von Mikroschnitten

Zu Beginn des Prozesses der Einbettung wurden die Organe in eine aufsteigende Alkoholreihe gelegt. Dies erfolgte für 2 x 30 Minuten in 96% Ethanol (vergällt mit 1% Methylmethyleketon und 0,001% Bitrex) und 2 x 45 Minuten in 99% Ethanol (mit 1% Petrolether). Anschließend wurden die Organe für 45 Minuten in Xylol eingelegt. Die Paraffineinbettung erfolgte mit Hilfe eines Paraffineinbettgerätes (EG1150H, Leica Biosystems, WetzlarNussloch). Die Organkassetten

(Sanova, Wien, Österreich) wurden nachfolgend für 3 x 45 Minuten in ein Paraffinbad mit flüssigem Paraffin (Paraplast) gelegt. Anschließend erfolgte die eigentliche Einbettung der Organe paarweise mit gegenüberliegenden Hili. Das Aushärten der Organblöcke erfolgte für mehrere Stunden auf einer Kühlplatte (EG 50 C; Leica, Nussloch) bei -5°C. Die Anfertigung von Mikroschnitten aus den Paraffinblöcken erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms (RM2255; Leica, Nussloch). Es wurden Schnitte von 3µm Dicke angefertigt und jeweils zwei Schnitte unter Zuhilfenahme eines Wasserbades faltenfrei auf Objekträger (SuperFrost®plus, Menzel, Braunschweig) aufgetragen. Zur Trocknung wurden die Objekträger mit den Paraffinschnitten kurz auf einer Heizplatte bei 37°C (H 1220; Leica, Nussloch) und anschließend für mindestens 12 Stunden in einen Trockenschrank (MiniOven MK II; MWG Biotech, Ebersberg) bei 37°C gelegt. Die Lagerung der Objekträger erfolgte anschließend bei Raumtemperatur.

2.5.2 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der T-Lymphozyteninfiltration

Der Nachweis der Infiltration und die Quantifizierung der T-Lymphozyten in der Niere erfolgte immunhistochemisch mit Hilfe des T-Zell-spezifischen CD-3-Antikörpers. Nach Entparaffinierung der Mikroschnitte mit EZ-DeWAX™, Rehydratation und Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Antigenfreilegung in Citratpuffer (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinatriumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) für 4 Minuten bei einer Temperatur von 125°C in einem Autoklav (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark). Anschließend wurden die Mikroschnitte zunächst für 18 Minuten im Autoklav und dann für 5 Minuten im Waschpuffer PBS (pH 7,4) abgekühlt. Um nach der Antigenfreilegung die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol gelagert. Durch die anschließende Lagerung für 20 Minuten in Power-Block-Lösung 1:10 wurden unspezifische Reaktionen verhindert. Nachfolgend wurden die Mikroschnitte mit dem monoklonalen Anti-CD3-Primärantikörper 1:50 verdünnt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes *goat anti rat* IgG 1:100 eingesetzt. Die Anfärbung erfolgte durch Hinzufügen des Peroxidase-Systems Avidin/Biotin-Komplexes (Vectastain® Elite® ABC Kit) und des Substrat-Chromogen-Systems Diaminobenzidin/ Imidazol-Hydrogenperoxidlösung (DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogene System). Zur Gegenfärbung wurde Methylenblau-Lösung 0,05% (Löfflers Methylenblau 0,5% 1:10 in Aqua dest.) verwendet. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) dehydriert und mit Eukitt® versiegelt. Zum Nachweis und zur Quantifizierung der T-Lymphozyteninfiltration wurden verblindet pro Organ alle positiven

Zellen in 20 Feldern abwechselnd in Mark- und Rindenregion unter 400-facher Vergrößerung ausgezählt (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.5.3 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der M2-Makrophageninfiltration

Zur Beurteilung der Infiltration der neonatalen Mausnieren mit M2-Makrophagen wurden immunhistochemische Färbungen mit einem für M2-Makrophagen spezifischen Galectin-3-Antikörper (früher MAC-2) durchgeführt. Nach Entparaffinierung der Mikroschnitte mit EZ-DeWAX™, Rehydratation und Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Permeabilisierung in 100% Methanol für 15 Minuten bei -20°C sowie die anschließende Spülung in PBS Waschpuffer. Zur Antigenfreilegung wurden die Mikroschnitte für 4 Minuten bei einer Temperatur von 125°C in Citratpuffer (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinatriumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) in einem Autoklav (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) behandelt und anschließend 18 Minuten hierin abgekühlt. Es folgte das Waschen für 5 Minuten in PBS und die Neutralisation für 10 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS und Umkreisen der Schnitte mit DakoPen zum Einsparen von Reagenzien, erfolgte das Blocken in 1% BSA in PBS für 10 Minuten. Die nachfolgende Inkubation der Mikroschnitte mit dem monoklonalen Primärantikörper MAC-2 (Galectin-3) *rat-anti mouse* 1:400 – 1:600 in PBS erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Negativkontrollen wurden in derselben Zeit mit PBS inkubiert. Es folgte das Waschen der Schnitte für zweimal 5 Minuten in PBS und die Inkubation der Mikroschnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper *goat anti rat* IgG 1:100 verdünnt in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem zweimaligem Waschen in PBS wurden die Mikroschnitte durch Hinzufügen des Peroxidase-Systems Avidin/Biotin-Komplexes (Vectastain® Elite® ABC Kit) für 30 Minuten und des Substrat-Chromogen-Systems Diaminobenzidin/ Imidazol-Hydrogenperoxidlösung (DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogene System) für 5 Minuten angefärbt. Zwischen den Schritten erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS Waschpuffer und anschließend die Spülung für zweimal 5 Minuten in Leitungswasser. Zur Gegenfärbung der Mikroschnitte wurde Methylenblau-Lösung 0,05% (Löfflers Methylenblau 0,5% 1:10 in Aqua dest.) verwendet. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) dehydriert, für zweimal 5 Minuten in Xylol gelagert und mit Eukitt® versiegelt. Die Auswertung der Infiltration der Nieren mit Galectin-3 positiven Makrophagen erfolgte durch verblindetes Auszählen von je 20 Gesichtsfeldern pro Organ unter 400-facher Vergrößerung abwechselnd in Mark- und Rindenschicht, wobei zwischen Galectin-3 positiven Zellen im Interstitium und in den Glomeruli unterschieden wurden (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.5.4 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen Apoptose

Um die renale Apoptose in den neonatalen Mausnieren zu beurteilen, wurde die DNA-Fragmentierung in den Zellkernen apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung (*terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) nachgewiesen. Zunächst wurden die Mikroschnitte für zweimal fünf Minuten in EZ-DeWAX™ entparaffiniert und anschließend für jeweils 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Die Antigen-Demaskierung der Schnitte erfolgte durch die Behandlung mit Proteinase K (Konzentration 20µg/ml) für 10 Minuten. Nach zweimaligem Spülen für je 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte zur Neutralisierung für 5 Minuten in 3% H₂O₂ gelagert. Nach erneutem zweimaligem Waschen für je 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte zum Einsparen von Reagenzien mit DakoPen eingekreist. Die weitere TUNEL-Färbung wurde mit dem Färbeikit ApopTag® Peroxidase Kit-*In situ* Apoptosis Detection Kit der Firma Millipore gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde für 5 Minuten ein Equilibration Buffer auf die Mikroschnitte pipettiert und die Schnitte anschließend 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um die apoptotischen Zellkerne enzymatisch zu markieren, wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C mit TdT-Enzym (*terminal desoxynucleotidyl transferase*) in Reaktionspuffer inkubiert, wodurch an den DNA-Bruchenden freiwerdende Hydroxygruppen (3'-OH) durch das Enzym TdT (*terminal desoxynucleotidyl transferase*) mit Nukleotiden (normale und Digoxigenin-gekoppelte Nukleotide in zufälliger Abfolge) markiert wurden. Die Negativkontrollen wurden mit PBS behandelt. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, erfolgte die Behandlung unter regelmäßiger Bewegung für 30 Minuten in vorgewärmtem Stop/Wash-Buffer in Aqua dest.. Nach zweimaligem Spülen für 5 Minuten in PBS wurde mit 1% BSA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur geblockt und erneut für 5 Minuten in PBS gewaschen. Durch Inkubation der Schnitte in Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Conjugate für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die enzymatisch markierten Nukleotide schließlich detektiert. Anschließend wurden die Mikroschnitte dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Färbung mit dem DAB Peroxidase Substrate Kit für 5 Minuten in DAB (3,3'-Diaminobenzidin) gelagert, wodurch die Peroxidasereaktion mit DAB zur spezifischen Anfärbung apoptotischer Zellen führte. Nach Spülung für zweimal 5 Minuten in Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Lagerung der Objektträger für 3 Minuten in 0,05% Methylenblau-Lösung (Löfflers Methylenblau 0,5% 1:10 in Aqua dest.). Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) dehydriert, für zweimal 5 Minuten in Xylol gelagert und mit Eukitt® versiegelt. Die Auswertung der renalen Apoptose erfolgte verblindet durch Auszählung der TUNEL-positiven Zellen in Verbindung mit kernmorphologischen Kriterien der Apoptose. Hierfür wurden 20 nicht-überlappende Gesichtsfelder pro Organ abwechselnd in Mark- und Rindenregion am Mikroskop (LeicaDM

1000) unter 400facher Vergrößerung betrachtet. Die Datenerhebung erfolgte getrennt für die Apoptose tubulärer, interstitieller und glomerulärer Zellen (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.5.5 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen Proliferation

Die Beurteilung der renalen Proliferation erfolgte mittels immunhistochemischer Anfärbung des Proliferation-spezifischen nukleären Proteins Ki-67. Nach Entparaffinierung der Mikroschnitte mit EZ-DeWAX™ für zweimal 5 Minuten wurden diese dreimal für jeweils 5 Minuten in Aqua dest. rehydriert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Zur Antigenfreilegung wurden die Mikroschnitte für 4 Minuten bei einer Temperatur von 125°C in Citratpuffer (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinatriumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) in einen Autoklav (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) verbracht und diese anschließend darin für 18 Minuten zur Abkühlung belassen. Nach einer Waschung für 5 Minuten in PBS folgte die Neutralisierung für 20 Minuten in 3% H₂O₂ in Methanol, das erneute zweimalige Waschen für je 5 Minuten in PBS, sowie Einkreisen der Schnitte mit DakoPen. Zum Blocken wurden die Objektträger für 20 Minuten in Power Block (Universal Blocking Reagent 10x) 1:10 verdünnt mit Aqua dest. verbracht. Anschließend folgte eine kurze Spülung mit PBS und die Inkubation der Mikroschnitte mit dem Primärantikörper *rat-anti-mouse* Ki-67 1:25 verdünnt mit PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Negativkontrollen wurden entsprechend mit PBS behandelt. Es folgte das zweimalige Waschen für 5 Minuten mit PBS und die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper *goat-anti-rat* 1:100 in PBS für 30 Minuten. Anschließend wurden die Mikroschnitte zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen und mittels des Peroxidase-Systems Avidin/Biotin-Komplex (Vectastain® Elite® ABC Kit) durch Inkubation für 30 Minuten und des Substrat-Chromogen-Systems Diaminobenzidin/ Imidazol-Hydrogenperoxidlösung (DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogene System) für 5 Minuten angefärbt. Zwischen den Schritten wurden die Objektträger für zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Gegenfärbung des Nierenparenchyms erfolgte nach Spülung in Aqua dest. durch Zugabe von Hämatoxylin Mayer (Mayers Hämalaun) für 4 Minuten. Unter lauwarm fließendem Leitungswasser wurden die Objektträger schließlich gespült und die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) dehydriert, für zweimal 5 Minuten in Xylol gelagert und mit Eukitt® versiegelt. Die Auswertung der renalen Proliferation erfolgte durch verblindetes Auszählen aller Ki-67-positiven Zellen in Verbindung mit kernmorphologischen Proliferationskriterien in je 20 Gesichtsfeldern unter 400-facher Vergrößerung abwechselnd in Mark- und Rindenschicht. Die Datenerhebung erfolgte getrennt für die Proliferation tubulärer, interstitieller und glomerulärer Zellen (n=8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.5.6 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der tubulären Atrophie

Um die tubuläre Basalmembran zu beurteilen und tubuläre Atrophie nachzuweisen wurde eine *Periodic acid-Schiff*-Reaktion angewendet (vereinfacht: PAS-Färbung), um Zuckerderivate (z.B. Polysaccharide, Glykogen) anzufärben. Zunächst wurden die Mikroschnitte mit EZ-DeWAX™ *tissue deparaffinization solution* entparaffiniert, rehydriert und mit Aqua dest. gespült. Anschließend erfolgte die Oxidierung der Glycolgruppen mit 1%iger Periodsäure und die Färbung durch Schiff's Reagenz und Mayers Hämatoxylin. Zwischen den Schritten wurden die Schnitte mit Aqua dest. oder Leitungswasser gespült. Abschließend erfolgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) und die Versiegelung mit Eukitt®. Die Auswertung und der Nachweis von tubulärer Atrophie erfolgte durch die Beurteilung von Veränderungen der gefärbten tubulären Basalmembran. Hierzu zählten Verdickung (*thickening*), Zerfaserung (*duplication*), Wellenbildung (*wrinkling*) und Verdünnung (*thinning*). Unter 400-facher Vergrößerung am Mikroskop (LeicaDM 1000) wurden pro Organ jeweils 20 nicht-überlappende Gesichtsfelder verblindet ausgewertet. Die Datenerhebung der tubulären Atrophie erfolgte für proximale und distale Tubuli getrennt (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.5.7 Histologische Färbung und morphometrische Analyse der renalen interstitiellen Fibrose

Die Beurteilung der interstitiellen Fibrose erfolgte mittels α -SMA-Färbung zum Nachweis aktiver Myofibroblasten und mithilfe einer Masson Trichrome-Färbung zum Nachweis von Kollagenfasern. Für die α -SMA-Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Mikroschnitte mit EZ-DeWAX™ *tissue deparaffinization solution* für zweimal fünf Minuten, mit Aqua dest. für dreimal fünf Minuten und die Spülung mit Leitungswasser. Anschließend wurden die Oberflächenproteine durch Lagerung in Citratpuffer pH6 (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinatriumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) für 30 Sekunden bei 125°C im Dampfdrucktopf (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) und 10 Sekunden bei 90°C demaskiert und die Schnitte anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach zweimaliger Waschung mit Waschpuffer (1 x TBS - 0,02% Tween®) erfolgt zur Neutralisierung die Inkubation für 20 Minuten in 3% H_2O_2 in Methanol und anschließend eine erneute zweimalige Waschung mit Waschpuffer (1 x TBS - 0,02% Tween®). Um Reagenzien zu sparen, wurden die Schnitte mit DakoPen eingekreist. Die nächsten Schritte wurde mit dem Färbeikit Histostain Sp Kit (Broad Spectrum AEC, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst erfolgte die Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in Blocking-Solution und anschließend die Inkubation

mit dem Erstantikörper Anti- α -SMA in einer Konzentration von 1:5000 gelöst mit Waschpuffer (1 x TBS - Tween®) und 1,5% Blocking-Solution für eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von zweimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer (1 x TBS - Tween®). Anschließend erfolgte die Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen für zweimal fünf Minuten in Waschpuffer (1 x TBS - Tween®) wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten mit Streptavidin-Conjugat bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zweimal fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Färbung mit Chromogen-Substrat durch Inkubation für maximal sechs Minuten und die erneute Waschung für zweimal fünf Minuten mit Waschpuffer. Zur Gegenfärbung des Nierengewebes wurden die Schnitte für maximal acht Minuten mit Hämatoxylin inkubiert, anschließend in Leitungswasser gewaschen und mit der wässrigen Aqueous Mount Solution des Kits eingedeckt. Die Auswertung der α -SMA-Färbung erfolgte verblindet durch Beurteilung von je 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Organ und Zählung der α -SMA-positiven Felder in einem 10 x 10 Raster abwechselnd im Mark- und Rindenbereich unter 400-facher Vergrößerung (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

Für die Masson Trichrome-Färbung wurden die Mikroschnitte für zweimal fünf Minuten mit EZ-DeWAX™ entparaffiniert, für dreimal fünf Minuten mit Aqua dest. rehydriert und mit Leitungswasser gespült. Zur Fixierung wurden diese anschließend für eine Stunde bei 60°C in Bouin's Solution inkubiert und mit Leitungswasser gespült. Es folgte die Färbung für zwei bis drei Minuten in Hämatoxylin Gill's Nr.3, Spülung unter fließendem Leitungswasser und Lagerung in Aqua dest. für eine Minute. Anschließend erfolgte die rote Fuchsin-Färbung durch Lagerung der Schnitte für 5 bis 10 Sekunden in Scarlet Acid Fuchsin-Lösung, fünfmalige kurze Spülung in Aqua dest. und dreimalige Lagerung für drei Minuten in Aqua dest. Es folgte die Inkubation für fünf Minuten in einer gemischten Lösung aus 25% Wolframatophosphorsäure, 25% Molybdatophosphorsäure in Aqua dest.. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger zur Blaufärbung der Kollagenfasern für mindestens 30 Minuten in Aniline blue Solution gelagert und kurz in Aqua dest. entfärbt. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) dehydriert, für zweimal fünf Minuten in Xylol gelagert und mit Eukitt® versiegelt. Zur Auswertung der Masson Trichrome-Färbung wurden unter 400-facher Vergrößerung verblindet pro Organ je 20 Gesichtsfelder abwechselnd in Mark- und Rindenregion in einem Raster mit 10 x 10 Feldern nach Kollagen-positiven Feldern ausgezählt (n= 8 pro Zeitpunkt und Gruppe).

2.6 Western Blots

Ergänzend zu den immunhistochemischen Untersuchungen wurden komplette neonatale Mausnieren nach unilateraler Ureterligatur und die Nieren der scheinoperierten neonatalen Mäuse mittels Western Blot auf die Expression von Galectin-3, Caspase-8, α -SMA und PDGFR- β untersucht.

Hierfür wurden die am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag entnommenen Mausnieren der verschiedenen Gruppen (UUO, IO und Sham) einzeln zur Homogenisierung zunächst in einen Proteinlysebuffer (Tris 50 mM, 2% SDS, 1mM Na2VO2), welcher Benzonasen (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Proteinaseinhibitoren (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) enthielt, verbracht, und anschließend für 10 Minuten bei 16.000 xg zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde der Proteingehalt mit einem BCA-Protein Assay Kit (Pierce™, Nr. 23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ermittelt und 15 μ g bis 20 μ g der Proteine elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gel bei 160 V für 80 Minuten aufgetrennt. Nach dem Aufbau des Blots erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland) für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 80 mA pro Membran. Antikörperspezifisch wurden die Membranen anschließend für 2 Stunden in TBS mit Tween®20, welche 5% fettfreies Milchpulver enthielt und/oder BSA, geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Für die Western Blots wurden Anti-Galectin-3 Antikörper (Nr. 19283, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), rabbit Anti-Caspase-8-Antikörper (1:500, Nr. 4927, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), Anti-PDGF-Rezeptor- β Antikörper (Nr. 4564, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) und anti- α -SMA Antikörper (Nr. A2547, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Als interne Ladungskontrolle und zur Normalisierung wurde GAPDH (Dunn, Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland) verwendet. Es folgte die Waschung der Blots dreimalig mit TBS mit Tween®20 und anschließend die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels Chemolumineszenz und Röntgendiagnostik (Röntgenfilm Kodak, Stuttgart, Deutschland) bei Antikörper-spezifischen Expositionszeiten. Die Quantifizierung der Banden erfolgte schließlich mit dem Densitometrie-Programm Image J. Pro Bande wurde somit die jeweilige Proteinexpression in einer einzelnen Niere dargestellt.

2.7 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SigmaStat® (Systat Software GmbH, San Jose, USA). Um die Experimental- und Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (*One Way Analysis of Variance*) durchgeführt, wobei die Rohdaten jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben wurden. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ festgelegt. Zum Ausschluss unbemerter relevanter Einflussfaktoren wurden die Ergebnisse der Experimentalgruppe jeweils mit den Daten der scheinoperierten Kontrollgruppe des gleichen Entwicklungsstadiums und Zeitpunkts verglichen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SigmaPlot® (Systat Software GmbH, San Jose, USA).

2.8 Chemikalien

Aniline blue Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-CD3 <i>rat anti human</i> CD3 IgG1 MCA 1477	AbD Serotec, Oxford, UK
Anti- α -SMA Antikörper Nr. A2547	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Galectin-3 Antikörper Nr. 19283	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-PDGF-Rezeptor- β Antikörper Nr. 4564	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
ApopTag Peroxidase Kit- In situ Apoptosis Detection Kit	EMD Millipore Corporation, Temecula, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Avidin/Biotin-Komplex Vectastain® Elite® ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Benzonasen	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
biotinyliertes <i>goat anti rat</i> IgG	Southern Biotech, Birmingham, USA
Bouin's Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citronensäure	Merck, Darmstadt
DAB Peroxidase Substrate Kit (With Nickel)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Diaminobenzidin/	Imidazol-	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Hydrogenperoxidlösung (DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogene System		
Dihydrat		Merck, Darmstadt
Ethanol 70%		Merck, Darmstadt
Ethanol 96% + 1 % Methylethylketon		Apotheke Innenstadt Universität München
Ethanol 99% + 1 % Petrolether		SAV Liquid Production, Flitsbach am Inn
Eukitt®		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EZ-DeWAX™ tissue deparaffinization solution		BioGenex, Fremont, USA
GAPDH (H86540M)		Dunn, Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
H ₂ O ₂ 3%		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämatoxylin Gill Nr. 3		Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
Hämatoxylin Mayers (Mayers Hämalaun)		Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
Histostain Sp Kit, Broad Spectrum AEC		Invitrogen, Waltham, USA
Löfflers Methylenblau 0,5 %		Merck, Darmstadt
MAC-2 (Galectin-3) <i>rat-anti mouse</i>		Cedarlane Laboratories, Burlington, Kanada
Methanol		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Molybdatophosphorsäure		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Monohydrat		Merck, Darmstadt
Paraplast, Schmelzpunkt 56°C		McCormick, Richmond, USA
PBS pH 7,4		Biochrome AG, Berlin
Periodsäure		Merck, Darmstadt
Pierce™ BCA Protein Assay Kit Nr. 23225		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Power Block Universal Blocking Reagent 10x		BioGenex, Fremont, USA
Proteinase K6		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinaseinhibitoren Complete Mini		Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland
<i>Rabbit</i> Anti-Caspase-8-Antikörper Nr. 4927		Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
<i>Rat-anti-mouse</i> Ki-67 Antikörper Nr. 7249		Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Scarlet Acid Fuchsin		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Schiff's Reagenz		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TBS Aqua dest. 1%		Merck, Darmstadt

Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Tween®20	AppliChem, Darmstadt
Wolframatophosphorsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Merck, Darmstadt

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewichtsentwicklung und Morphologie der neonatalen Mausniere nach unilateraler Ureterligatur

Das Körpergewicht der neonatalen Mäuse wurde am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag gemessen und zeigte eine kontinuierliche Zunahme. Am 3. Lebenstag lag das Körpergewicht bei durchschnittlich $1,8 \pm 0,4$ g, am 7. Lebenstag bei $3,5 \pm 1,5$ g, am 14. Lebenstag bei $5,9 \pm 3,3$ g und am 21. Lebenstag bei $7,4 \pm 5,3$ g. Aufgeschlüsselt nach Kontroll- und UUO-Gruppe wogen die Mäuse in der scheinoperierten Gruppe am 3. Lebenstag $1,8 \pm 0,4$ g und die UUO-Mäuse $1,8 \pm 0,3$ g. Am 7. Lebenstag wogen die scheinoperierten Mäuse $3,6 \pm 0,3$ g und die UUO-Mäuse $3,4 \pm 1,4$ g. Am 14. Lebenstag wogen die scheinoperierten Mäuse $5,6 \pm 2,1$ g und die UUO-Mäuse $6,1 \pm 3,0$ g. Am 21. Lebenstag lag das Körpergewicht der scheinoperierten Mäuse bei $7,7 \pm 5$ g und das Gewicht der UUO-Mäuse bei $7,1 \pm 0,8$ g. Die Körpergewichtsentwicklung der scheinoperierten und unilaterale ureterligierten Mäusen war zu keinem Zeitpunkt signifikant different.

Morphologisch wiesen die entnommenen Nieren bereits einen Tag nach der unilateralen Ureterligatur eine sichtbare Hydronephrose mit Erweiterung des Nierenbeckenkelchsystems auf, welche im zeitlichen Verlauf weiter zunahm. Zusätzlich zeigte sich in den UUO-Nieren eine zunehmende Verdrängung des Nierenparenchyms sowie eine zystische Erweiterung der distalen Tubuli und Sammelrohre. Die intakte kontralaterale Niere zeigte im Verlauf eine kompensatorische Hypertrophie, wohingegen die Nieren der scheinoperierten Kontrollgruppe keine morphologischen Auffälligkeiten aufwiesen.

3.2 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Lymphozyteninfiltration

Der Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Lymphozyteninfiltration in der neonatalen Mausniere wurde immunhistochemisch mit Hilfe des T-Zell-spezifischen CD-3-Antikörpers untersucht (Abb. 5). Tabelle 2 zeigt die Infiltration von CD3-positiven T-Lymphozyten in der ureterligierten Niere (UUO), in der kontralateralen Niere (IO) und in der Niere der scheinoperierten Kontrolle (Sham) je Zeitpunkt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Abbildung 6 stellt die Auswertung der CD3-Lymphozyteninfiltration der UUO-Nieren und der IO-Nieren bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle (Sham) graphisch dar.

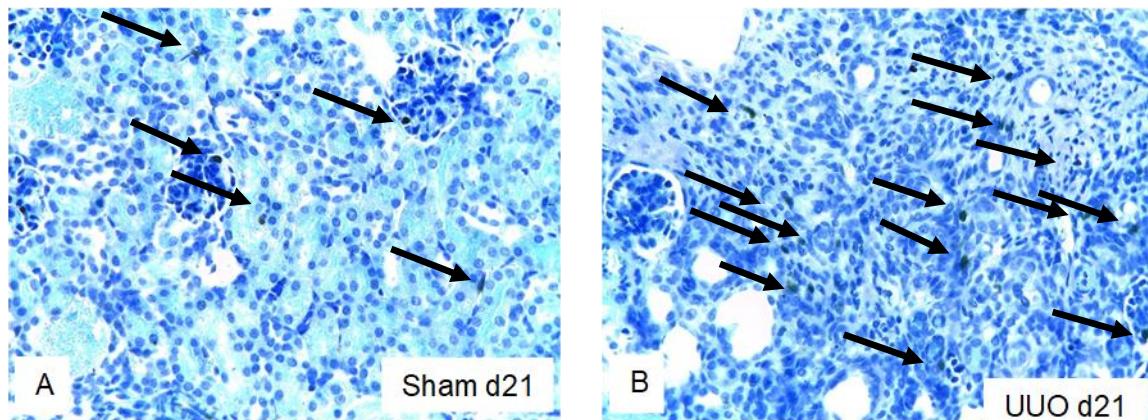


Abbildung 5: Immunhistochemische CD3-Färbung (Pfeile) am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400

	UUO	IO	Sham
3. Lebenstag (d3)	$17,8 \pm 9,06$	$12,3 \pm 6,08$	$11,5 \pm 7,26$
7. Lebenstag (d7)	$82,9 \pm 41,4$	$39,3 \pm 20,3$	$38,9 \pm 21,1$
14. Lebenstag (d14)	$182,8 \pm 116,2$	$58,4 \pm 9,9$	$65,4 \pm 11,1$
21. Lebenstag (d21)	$560,8 \pm 238,1$	$78,3 \pm 24,6$	$83,1 \pm 18,9$

Tabelle 2: CD3-positive T-Lymphozyten als Mittelwerte \pm Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)

Die unilaterale Ureterligatur induzierte eine kontinuierliche Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten in der neonatalen Mausniere (Abb.6). Am 3. Lebenstag zeigte sich eine 1,5-fache Zunahme CD3-positiver Lymphozyten in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (UUO $17,8 \pm 9,06$ versus Sham $11,5 \pm 7,26$), die noch nicht statistisch signifikant war. Im weiteren Verlauf stieg die T-Zellinfiltration in der UUO-Niere kontinuierlich und statistisch signifikant auf das 2,1-fache am 7. Lebenstag ($82,9 \pm 41,4$ versus $38,9 \pm 21,1$; $p < 0,05$), auf das 2,7-fache am 14. Lebenstag ($182,8$ versus $65,4$; $p < 0,001$) und auf das 7-fache am 21. Lebenstag an ($560,8$ versus $83,1$; $p < 0,001$). In den intakten Nieren der kontralateralen Gegenseite zeigte sich keine Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten.

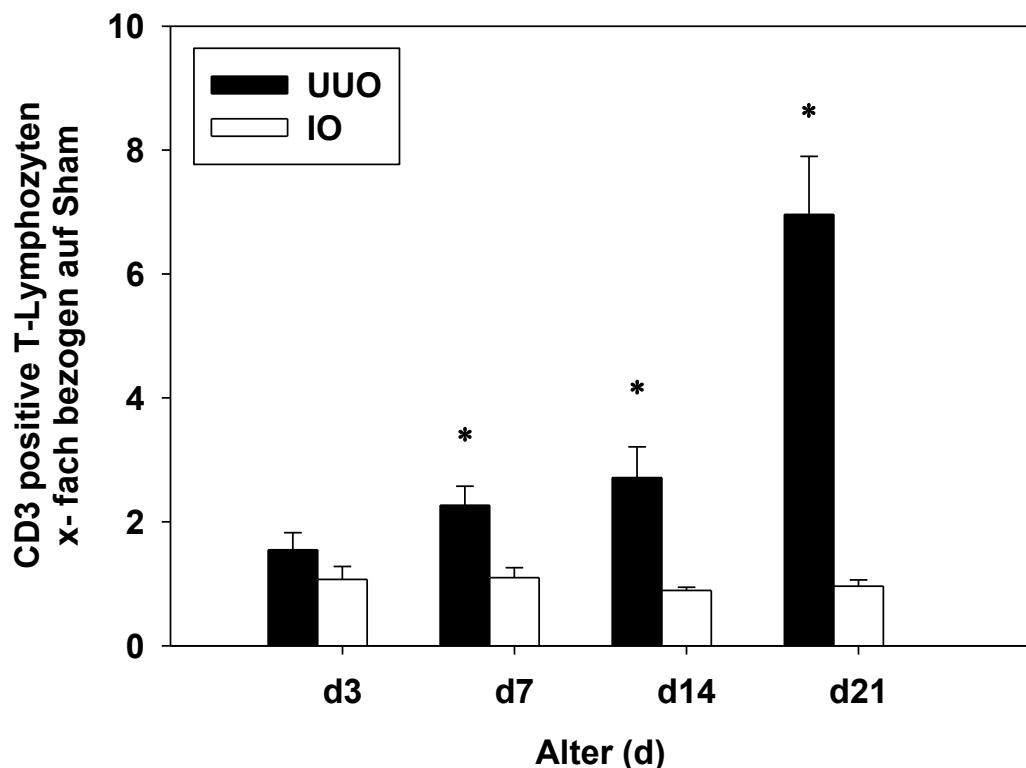


Abbildung 6: Morphometrische Analyse der Infiltration von CD3-positiven T-Lymphozyten in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen (IO) neonatalen Mausnieren an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

3.3 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Makrophageninfiltration

Zur Beurteilung des Effekts der unilateralen Ureterligatur auf die Makrophageninfiltration wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem M2-Makrophagen-spezifischen Galectin-3-Antikörper durchgeführt (Abb. 7). In Tabelle 3 sind die Galectin-3 positiven Zellen pro Gesichtsfeld getrennt nach interstitieller und glomerulärer Lokalisation in den ureterligierten Nieren (UUO), den kontralateralen Nieren (IO) und in den scheinoperierten Kontrollen (Sham) am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag aufgeführt. Abbildung 8 zeigt die Auswertung der Galectin-3 positiven Zellen pro Gesichtsfeld jeweils interstitiell und glomerulär in den ureterligierten Nieren bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe. Aufgrund der konstitutiven tubulären Expression von Galectin-3 wurde das tubuläre Kompartiment nicht ausgewertet, sondern nur die interstitielle und glomeruläre Expression.

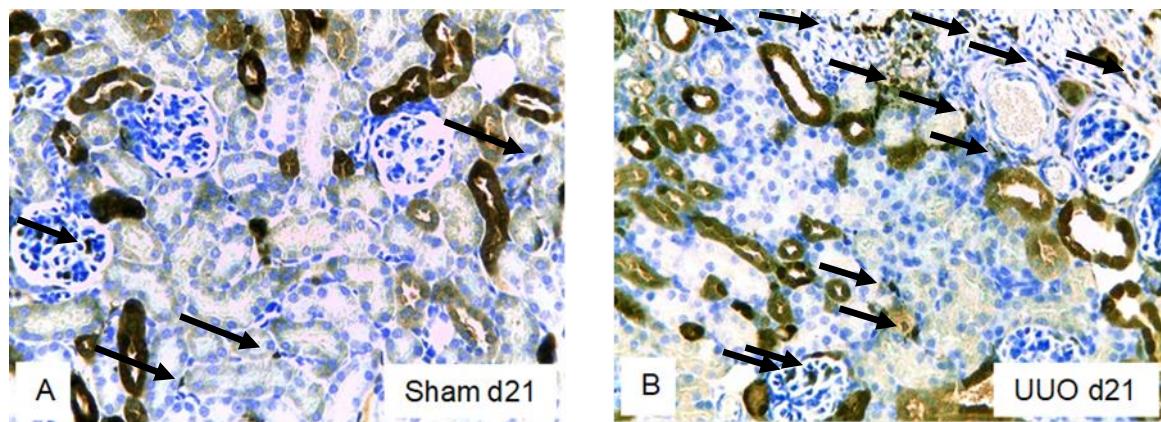


Abbildung 7: Immunhistochemische Galectin-3-Färbung am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400

	UUO		IO		Sham	
	interstitiell	glomerulär	Interstitiell	glomerulär	interstitiell	glomerulär
3. Lebenstag	6,25 ± 2,72	1,98 ± 1,13	5,49 ± 2,36	2,05 ± 0,66	4,47 ± 1,90	2,22 ± 0,78
7. Lebenstag	11,4 ± 5,93	2,73 ± 1,45	6,94 ± 3,84	2,97 ± 0,64	6,54 ± 2,53	4,66 ± 3,48
14. Lebenstag	60,1 ± 27,7	2,06 ± 1,28	5,77 ± 1,90	2,05 ± 1,04	5,59 ± 2,42	2,46 ± 1,22
21. Lebenstag	173,2 ± 37,4	3,33 ± 1,44	8,61 ± 3,78	1,72 ± 0,66	7,44 ± 4,28	2,00 ± 0,71

Tabelle 3: Galectin-3-positive Makrophagen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)

Die unilaterale Ureterligatur induzierte eine signifikante Zunahme Galectin-3 positiver Makrophagen in der neonatalen Mausniere am 14. und 21. Lebenstag (Abb.8). Am 3. Lebenstag zeigte sich in den ureterligierten Nieren eine 1,4-fache Zunahme interstitieller Galectin-3 positiver Zellen im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (UUO $6,25 \pm 2,72$ versus Sham $4,47 \pm 1,90$) und am 7. Lebenstag eine 1,7-fache Zunahme ($11,4 \pm 5,93$ versus $6,54 \pm 2,53$), die jedoch statistisch nicht signifikant waren. Am 14. Lebenstag zeigte sich eine 11-fache Zunahme ($60,1 \pm 27,7$ versus $5,59 \pm 2,42$; $p<0,001$) und am 21. Lebenstag eine 23-fache Zunahme interstitieller Galectin-3 positiver Makrophagen in der neonatalen Mausniere mit UUO ($173,2 \pm 37,4$ versus $7,44 \pm 4,28$; $p<0,001$).

Die Expression von Galectin-3 positiven Zellen in den Glomeruli änderte sich nicht zwischen dem 3. und 14. Lebenstag. Am 21. Lebenstag war jedoch ein statistisch signifikanter Anstieg von Galectin-3 in den Glomeruli der UUO-Niere nachweisbar. Die Galectin-3 positiven Zellen in den Glomeruli nahmen am 21.LT um das 1,7-fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle zu ($3,33 \pm 1,44$ versus $2,00 \pm 0,71$; $p<0,05$). Während interstitiell eine massive und kontinuierliche Zunahme von M2-Makrophagen nachweisbar war, zeigte sich in den Glomeruli lediglich ein geringer Anstieg Galectin-3 positiver Makrophagen.

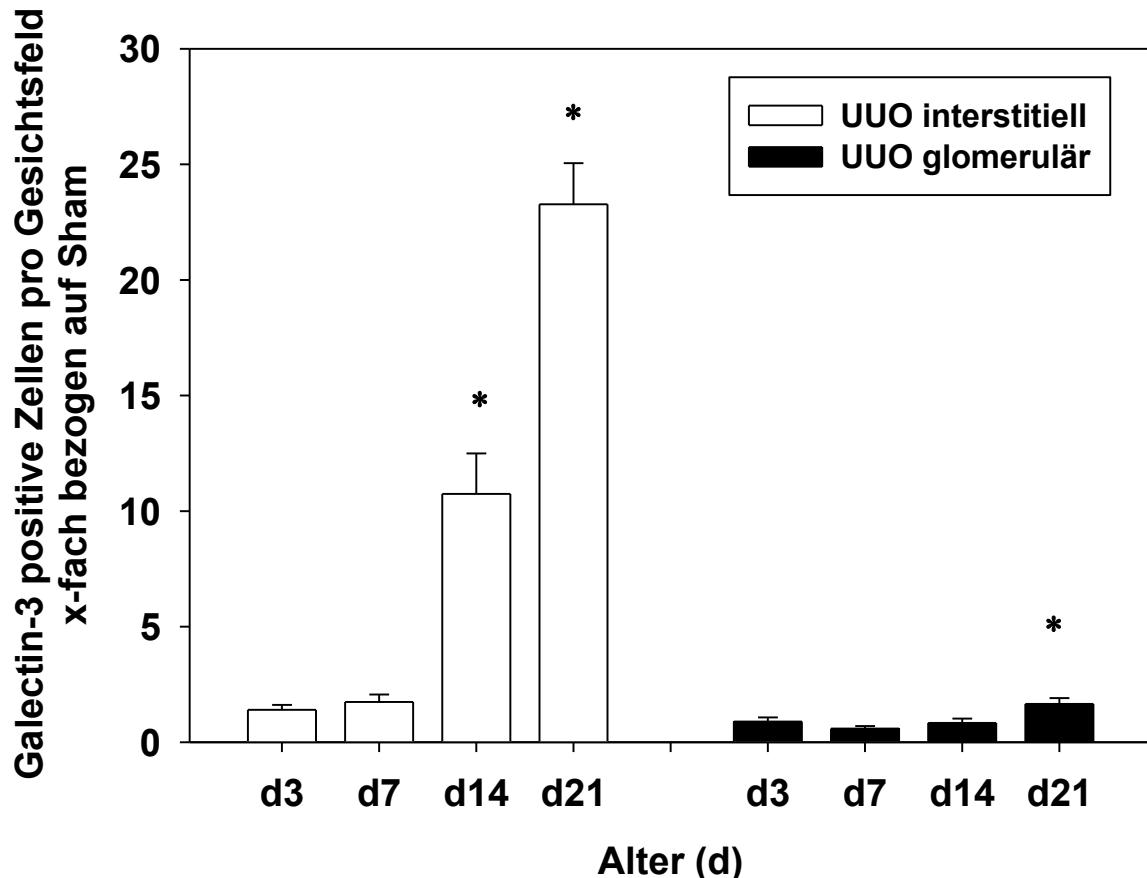


Abbildung 8: Morphometrische Analyse der Infiltration von Galectin-3-positiven Makrophagen pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; * $p<0,05$ UUO vs Sham

3.4 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die Proliferation

Zur Beurteilung der Proliferation in den neonatalen Mausnieren wurden immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferations-spezifischen Antikörper Ki-67 durchgeführt (Abb. 9). Die Tabellen 4, 5 und 6 zeigen die Ki-67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in verschiedenen Kompartimenten der neonatalen Mausniere nach UUO, in den Nieren der kontralateralen Gegenseite (IO) und in der scheinoperierten Kontrolle (Sham) am 3., 7., 14. und 21.

Lebenstag. In Abbildung 10 wird die Auswertung der Expression von Ki-67 pro Gesichtsfeld in den ureterligierten Nieren bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag graphisch dargestellt.

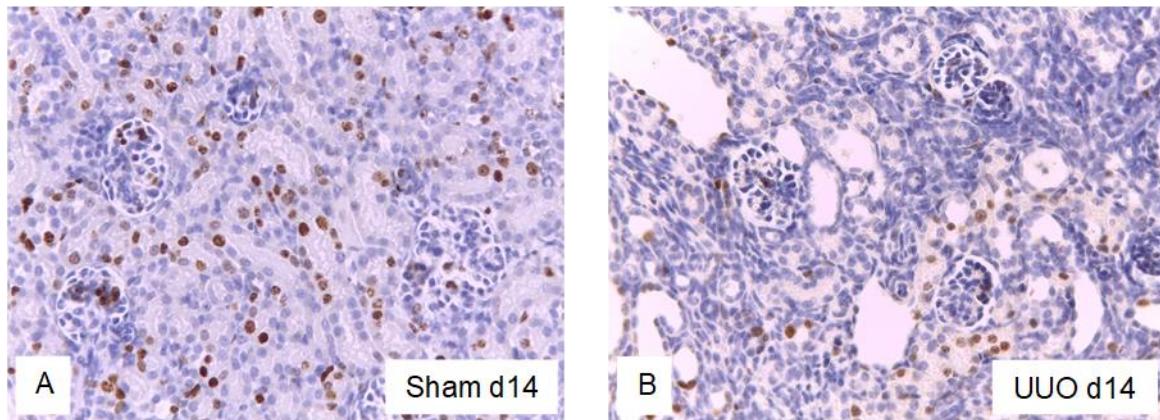


Abbildung 9: Immunhistochemische Ki-67-Färbung am 14. Lebenstag (d14) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung $\times 400$

	UUO tubulär	IO tubulär	Sham tubulär
3. Lebenstag	$446,9 \pm 81,7$	$340,7 \pm 53,4$	$359,6 \pm 45,9$
7. Lebenstag	$238,7 \pm 43,9$	$319,7 \pm 55,9$	$287,5 \pm 66,3$
14. Lebenstag	$59,7 \pm 32,4$	$262,9 \pm 54,1$	$366,4 \pm 433,5$
21. Lebenstag	$5,57 \pm 3,14$	$20,6 \pm 11,7$	$26,1 \pm 13,8$

Tabelle 4: Ki-67-positive tubuläre Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte \pm Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)

Infolge der Ureterligatur kam es zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation tubulärer Zellen. Während am 3. Lebenstag, 24h nach UUO noch ein 1,2-facher Anstieg proliferierender Tubuluszellen im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle nachweisbar war (UUO $446,9 \pm 81,7$ versus Sham $359,6 \pm 45,9$; $p < 0,05$), zeigte sich am 7. Lebenstag bereits eine Reduktion proliferierender Zellen um 17% ($238,7 \pm 43,9$ versus $287,5 \pm 66,3$), am 14. Lebenstag eine signifikante Reduktion um 84% ($59,7 \pm 32,4$ versus $366,4 \pm 433,5$; $p < 0,001$) und am 21. Lebenstag eine signifikante Reduktion der tubulären Proliferation um 79% ($5,57 \pm 3,14$ versus $26,1 \pm 13,8$; $p < 0,001$) in der neonatalen UUO-Niere.

	UUO interstitiell	IO interstitiell	Sham interstitiell
3. Lebenstag	$296,9 \pm 62,8$	$275,4 \pm 62,9$	$281,0 \pm 46,4$
7. Lebenstag	$196,5 \pm 43,7$	$172,9 \pm 59,8$	$170,4 \pm 50,6$
14. Lebenstag	$76,0 \pm 54,5$	$77,8 \pm 28,9$	$68,1 \pm 20,5$
21. Lebenstag	$36,1 \pm 19,9$	$14,8 \pm 8,4$	$21,3 \pm 11,0$

Tabelle 5: Ki-67-positive interstitielle Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte \pm Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)

Im Gegensatz zur reduzierten Proliferation tubulärer Zellen nahm die Proliferation interstitieller Zellen nach UUO nicht ab, sondern tendenziell eher zu (Abb.10). Diese Zunahme war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Am 3. Lebenstag lag die Anzahl proliferierender interstitieller Zellen in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle bei $296,9 \pm 62,8$ versus $281,0 \pm 46,4$. Am 7. Lebenstag betrug die Anzahl proliferierender interstitieller Zellen in den UUO-Nieren $196,9 \pm 43,7$ versus $170,4 \pm 50,6$ in der Kontrolle. Am 14. Lebenstag lag die Anzahl proliferierender interstitieller Zellen in den UUO-Nieren bei $76,0 \pm 54,5$ und am 21. Lebenstag bei $36,1 \pm 19,9$. Eine signifikante Zunahme der Proliferation interstitieller Zellen war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar (Abb.10).

	UUO glomerulär	IO Glomerulär	Sham glomerulär
3. Lebenstag	$12,1 \pm 3,72$	$11,8 \pm 2,87$	$18,9 \pm 6,00$
7. Lebenstag	$26,5 \pm 8,16$	$25,5 \pm 6,02$	$27,6 \pm 8,01$
14. Lebenstag	$15,9 \pm 9,92$	$12,5 \pm 6,96$	$11,4 \pm 4,95$
21. Lebenstag	$4,98 \pm 4,05$	$1,44 \pm 0,97$	$2,56 \pm 1,03$

Tabelle 6: Ki-67-positive glomeruläre Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte \pm Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)

Die Proliferation glomerulärer Zellen war nur am 3. Lebenstag in der UUO-Gruppe statistisch signifikant reduziert. Hier zeigte sich in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe eine Reduktion proliferierender glomerulärer Zellen um 36% (UUO $12,12 \pm 3,72$ versus Sham $18,9 \pm 6,00$; $p < 0,01$). Am 7. Lebenstag lag die glomeruläre Proliferation in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe bei $26,5 \pm 8,16$ versus $27,6 \pm 8,01$. Am 14. Lebenstag betrug die Zahl proliferierender Glomeruli in den UUO-Nieren im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen $15,9 \pm 9,92$ versus $11,4 \pm 4,95$. Am 21. Lebenstag lag die Zahl proliferierender Zellen in den Glomeruli der UUO-Niere

bei $4,98 \pm 4,05$ versus $2,56 \pm 1,03$ in der Kontrolle. Statistisch signifikante Veränderungen bezüglich der glomerulären Proliferation waren vom 7. bis 21. LT nicht nachweisbar (Abb.10).

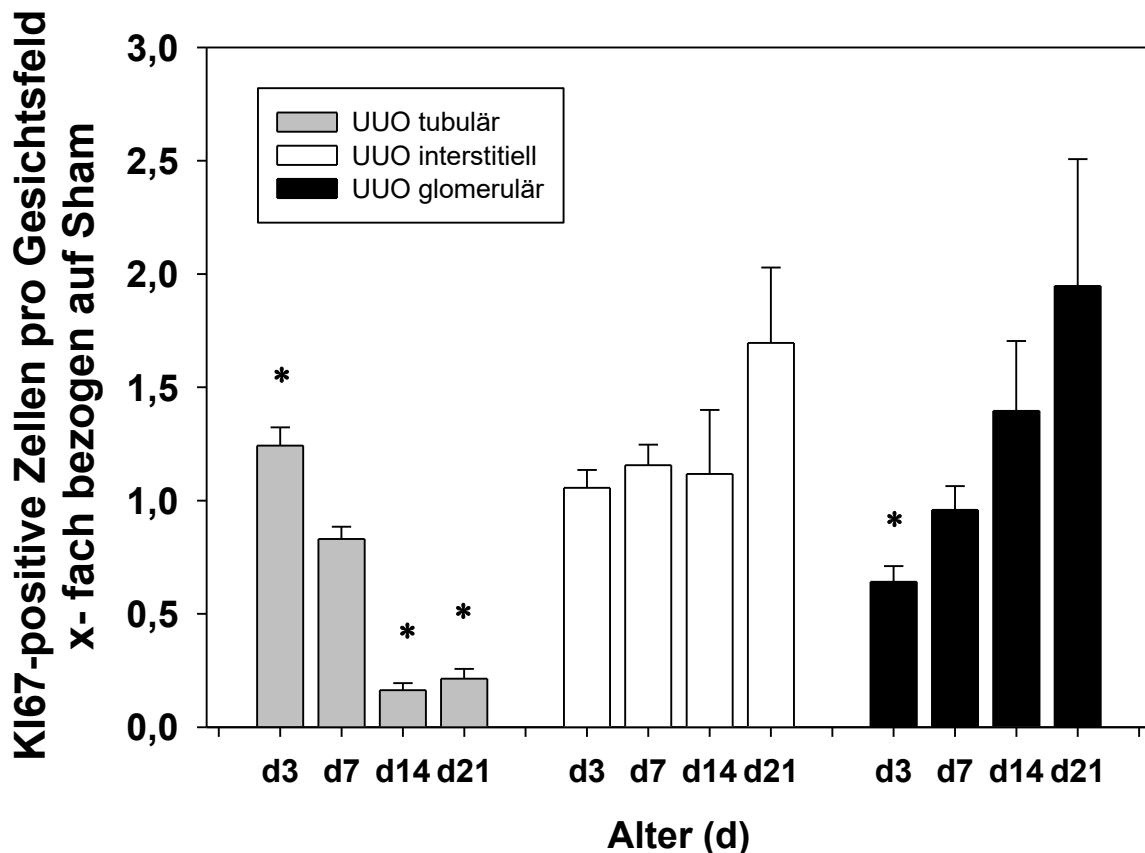


Abbildung 10: Morphometrische Analyse der Ki-67 positive Zellen pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren tubulär, interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

3.5 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die renale Apoptose

Um die renale Apoptose nach Ureterligatur in der neonatalen Mausniere zu beurteilen, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt (Abb. 11). Tabelle 7 zeigt die Anzahl tubulärer apoptotischer Zellen in den Nieren, Tabelle 8 die Anzahl interstitieller apoptotischer Zellen und Tabelle 9 die Anzahl glomerulärer apoptotischer Zellen in den neonatalen Mausnieren als Mittelwerte pro Gesichtsfeld \pm Standardabweichung. Abbildung 12 stellt die Auswertung der tubulären, interstitiellen und glomerulären Apoptose in der neonatalen Mausniere nach unilateraler Ureterligatur (UUO) bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham) graphisch dar.

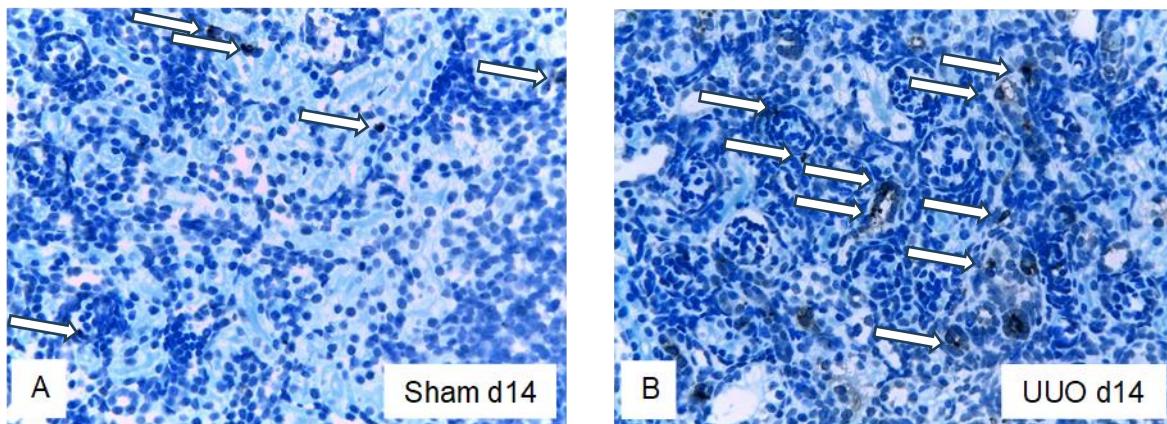


Abbildung 11: TUNEL-Färbung neonataler Mausnieren am 14. Lebenstag (d14) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400

	UUO tubulär	IO Tubulär	Sham tubulär
3. Lebenstag	8,06 ± 2,08	8,35 ± 1,75	9,27 ± 3,00
7. Lebenstag	18,8 ± 4,99	6,10 ± 1,92	7,89 ± 2,00
14. Lebenstag	28,6 ± 5,34	5,68 ± 1,27	5,71 ± 3,43
21. Lebenstag	21,9 ± 4,87	3,05 ± 2,60	2,69 ± 2,39

Tabelle 7: Tubuläre Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den Tubuli ureterligierter Nieren (UUO), in den kontralateralen Nieren (IO) und den Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham)

Die Ureterligatur induzierte im zeitlichen Verlauf in den neonatalen Mausnieren eine Zunahme tubulärer, interstitieller und glomerulärer Apoptose im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (Abb.12). Am 3. Lebenstag war die tubuläre Apoptose in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle noch unverändert (UUO $8,06 \pm 2,08$ versus Sham $9,27 \pm 3,00$). Am 7. Lebenstag zeigte sich eine 2,4-fache Zunahme der tubulären apoptotischen Zellen ($18,8 \pm 4,99$ versus $7,89 \pm 2,00$; $p<0,002$), am 14. Lebenstag eine 5-fache Zunahme ($28,6 \pm 5,34$ versus $5,71 \pm 3,43$; $p<0,001$) und am 21. Lebenstag eine 8,1-fache Zunahme ($21,9 \pm 4,87$ versus $2,69 \pm 2,39$; $p<0,001$) tubulärer apoptotischer Zellen in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Diese Zunahme war am 7., 14. und 21.LT jeweils statistisch signifikant (Abb.12).

	UUO interstitiell	IO Interstitiell	Sham interstitiell
3. Lebenstag	2,52 ± 0,78	2,75 ± 1,06	3,35 ± 1,07
7. Lebenstag	6,46 ± 1,81	2,81 ± 1,17	3,38 ± 1,48
14. Lebenstag	9,21 ± 1,75	1,85 ± 0,70	3,61 ± 2,33
21. Lebenstag	13,2 ± 4,41	2,79 ± 1,49	4,25 ± 3,43

Tabelle 8: Interstitielle Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung im Interstitium ureterligierter Nieren (UUO), kontralateraler Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham)

Die interstitielle Apoptose nahm ab dem 7. Lebenstag in den UUO-Nieren kontinuierlich und statistisch signifikant zu. Am 3. Lebenstag war die Anzahl der interstitiellen apoptotischen Zellen in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe noch unverändert (UUO 2,52 ± 0,78 versus Sham 3,35 ± 1,07). Am 7. Lebenstag konnte eine 1,7-fache Zunahme interstitieller apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (6,46 ± 1,81 versus 3,38 ± 1,48; p<0,002), am 14. Lebenstag eine 2,6-fache Zunahme (9,21 ± 1,75 versus 3,61 ± 2,33; p<0,001) und am 21. Lebenstag eine 3,1-fache Zunahme (13,2 ± 4,41 versus 4,25 ± 3,43; p<0,001). Die Zunahme der apoptotischen Zellen im Interstitium der UUO-Niere war vom 7. bis 21. Lebenstag statistisch signifikant.

	UUO glomerulär	IO glomerulär	Sham glomerulär
3. Lebenstag	0,45 ± 0,24	0,54 ± 0,18	0,64 ± 0,34
7. Lebenstag	0,60 ± 0,35	0,32 ± 0,18	0,41 ± 0,21
14. Lebenstag	0,76 ± 0,26	0,16 ± 0,10	0,53 ± 0,33
21. Lebenstag	1,34 ± 0,78	0,27 ± 0,21	0,29 ± 0,28

Tabelle 9: Glomeruläre Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den Glomeruli ureterligierter Nieren (UUO), kontralateraler Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham)

Die glomeruläre Apoptose zeigte nur am 21. Lebenstag in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle eine signifikante Zunahme. Am 3. Lebenstag lag die Anzahl apoptotischer Zellen in den Glomeruli ureterligierter Nieren bei 0,45 ± 0,24 im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (Sham 0,64 ± 0,34). Am 7. Lebenstag betrug die Anzahl apoptotischer Zellen in den Glomeruli der UUO-Niere 0,60 ± 0,35 versus 0,41 ± 0,21 in der Kontrolle, am 14. Lebenstag 0,76 ± 0,26 versus 0,53 ± 0,33 in der Kontrolle. Am 21. Lebenstag war eine 4,6-fache Zunahme apoptotischer Zellen in den Glomeruli ureterligierter Nieren

nachweisbar ($1,34 \pm 0,78$ versus $0,29 \pm 0,28$; $p<0,05$). Diese Zunahme glomerulärer Apoptose nach UUO war am 21. Lebenstag statistisch signifikant.

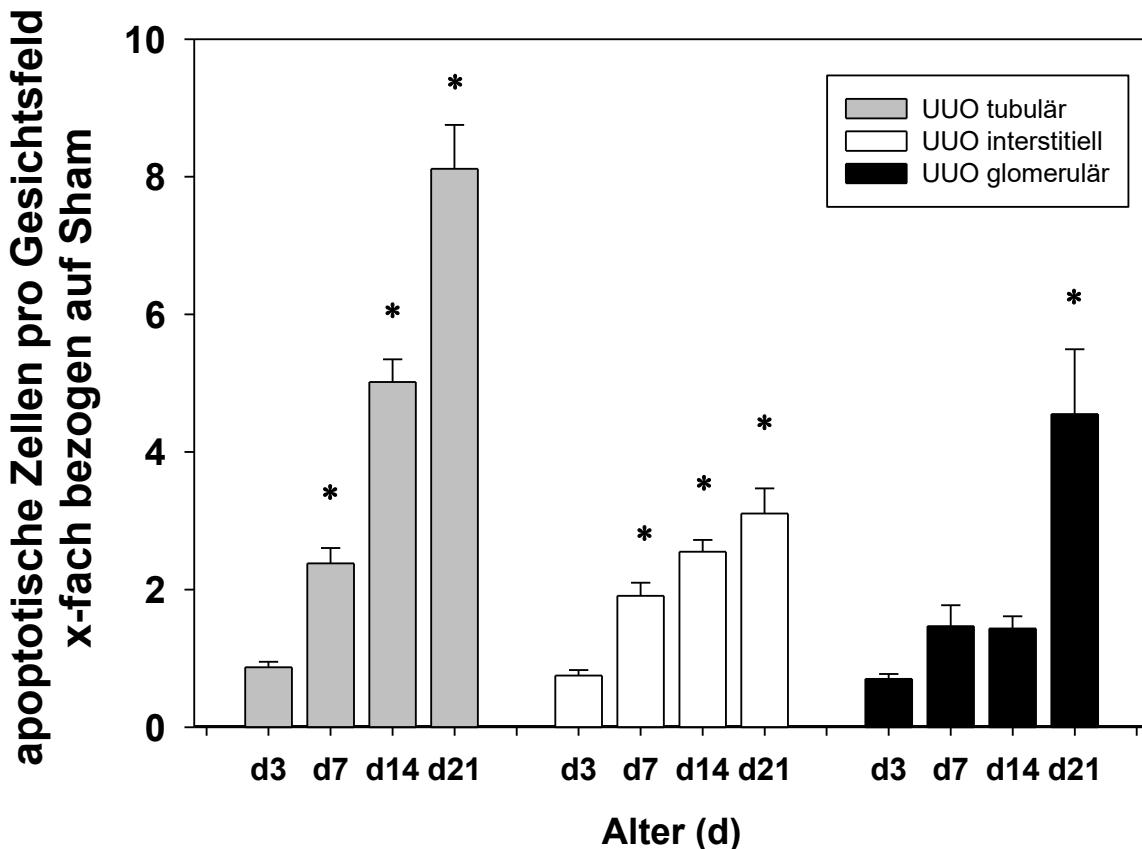


Abbildung 12: Morphometrische Analyse apoptotischer Zellen (TUNEL-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren tubulär, interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; * $p<0,05$ UUO vs Sham

Im Vergleich der verschiedenen Nierenkompartimente konnte in den Tubuli die stärkste Zunahme apoptotischer Zellen nach UUO nachgewiesen werden. Hier zeigte sich vom 7. bis 21. Lebenstag eine signifikante Zunahme tubulärer apoptotischer Zellen infolge der Ureterligatur. Auch im Interstitium kam es vom 7. bis 21. LT zu einer signifikanten Zunahme interstitieller apoptotischer Zellen. Die tubuläre Apoptose war jedoch im Verlauf zu jedem Zeitpunkt ausgeprägter als die interstitielle Apoptose. In den Glomeruli konnte erst am 21. Lebenstag eine Zunahme apoptotischer Zellen nach UUO nachgewiesen werden. Am 3. Lebenstag, bzw. 24 Stunden nach Ureterligatur, zeigte sich in keinem der Nierenkompartimente eine Änderung der Anzahl apoptotischer Zellen.

Diese Ergebnisse wurden teilweise vorab bereits publiziert [86].

3.6 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die renale interstitielle Fibrose

Die Entwicklung interstitieller Fibrose in der neonatalen Niere wurde einerseits mittels α -SMA-Färbung zum Nachweis von Myofibroblasten (Abb. 13) und andererseits mittels Masson Trichrome-Färbung zum Nachweis von Kollagenfasern (Abb. 16) untersucht. Tabelle 10 führt die Anzahl α -SMA-positiver Felder in einem 10 x 10 Raster pro Gesichtsfeld in der neonatalen Mausniere als Mittelwert \pm Standardabweichung auf. Abbildung 14 stellt die Auswertung der Anzahl α -SMA-positiver Felder pro Gesichtsfeld der ureterligierten Nieren (UUO) und der Nieren der intakten Gegenseite (IO) bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle graphisch dar. Abbildung 15 zeigt die Auswertung der α -SMA-positiven Felder pro Gesichtsfeld in der ureterligierten, der kontralateralen Niere und in den Nieren der scheinoperierten Kontrolle. In Tabelle 11 ist die Anzahl Kollagen-positiver Felder im 10 x 10 Raster pro Gesichtsfeld nach Masson Trichrome-Färbung als Mittelwert \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Auswertung der Kollagen-positiven Felder nach Masson Trichrome-Färbung in den ureterligierten Nieren (UUO) und den intakten kontralateralen Nieren (IO) pro Gesichtsfeld bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham) zeigt Abbildung 17. Die graphische Auswertung der Kollagenablagerungen in den ureterligierten Nieren (UUO), den Nieren der kontralateralen Gegenseite (IO) und den scheinoperierten Kontrollen (Sham) zeigt Abbildung 18.

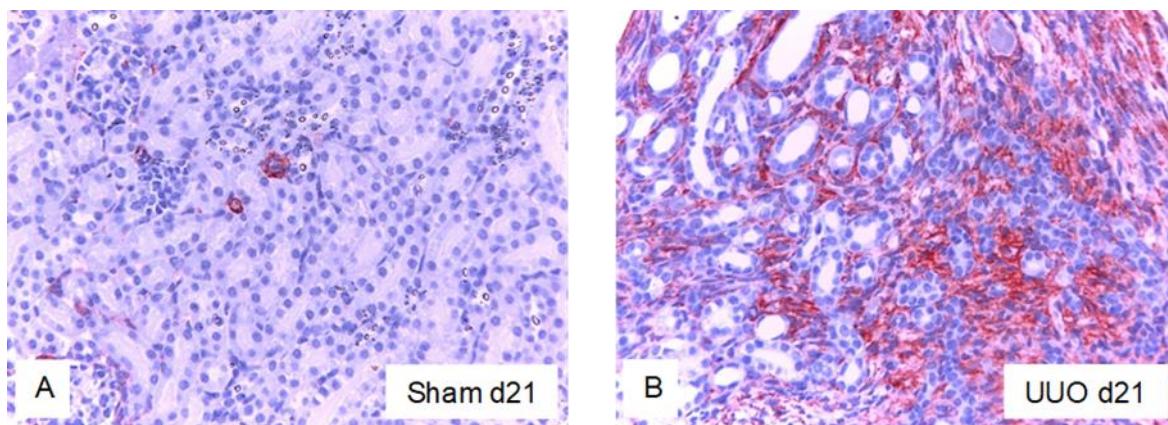


Abbildung 13: α -SMA-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400

	UUO	IO	Sham
3. Lebenstag	$80,6 \pm 6,56$	$73,9 \pm 8,94$	$67,5 \pm 11,9$
7. Lebenstag	$87,8 \pm 6,16$	$75,8 \pm 4,61$	$80,2 \pm 7,27$
14. Lebenstag	$84,2 \pm 12,1$	$70,7 \pm 5,24$	$66,4 \pm 5,43$
21. Lebenstag	$83,3 \pm 7,71$	$27,5 \pm 5,96$	$25,8 \pm 7,79$

Tabelle 10: α -SMA-positive Felder pro Gesichtsfeld als Mittelwerte \pm Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham)

Die unilaterale Ureterligatur induzierte eine signifikante Zunahme α -SMA positiver Myofibroblasten in der ureterligierten Niere (Abb. 14). Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,2-facher Anstieg aktiver Myofibroblasten in den ureterligierten Nieren (UUO $80,6 \pm 6,56$ α -SMA-positive Felder versus Sham $67,5 \pm 11,9$; $p<0,02$), am 7. Lebenstag ein 1,1-facher Anstieg ($87,8 \pm 6,16$ versus $80,2 \pm 7,27$; $p<0,05$), am 14. Lebenstag ein 1,3-facher Anstieg ($84,2 \pm 12,1$ versus $66,4 \pm 5,43$; $p<0,02$) und am 21. Lebenstag ein 3,2-facher Anstieg im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. In den Nieren der intakten kontralateralen Gegenseite zeigte sich keine Zunahme aktiver Myofibroblasten.

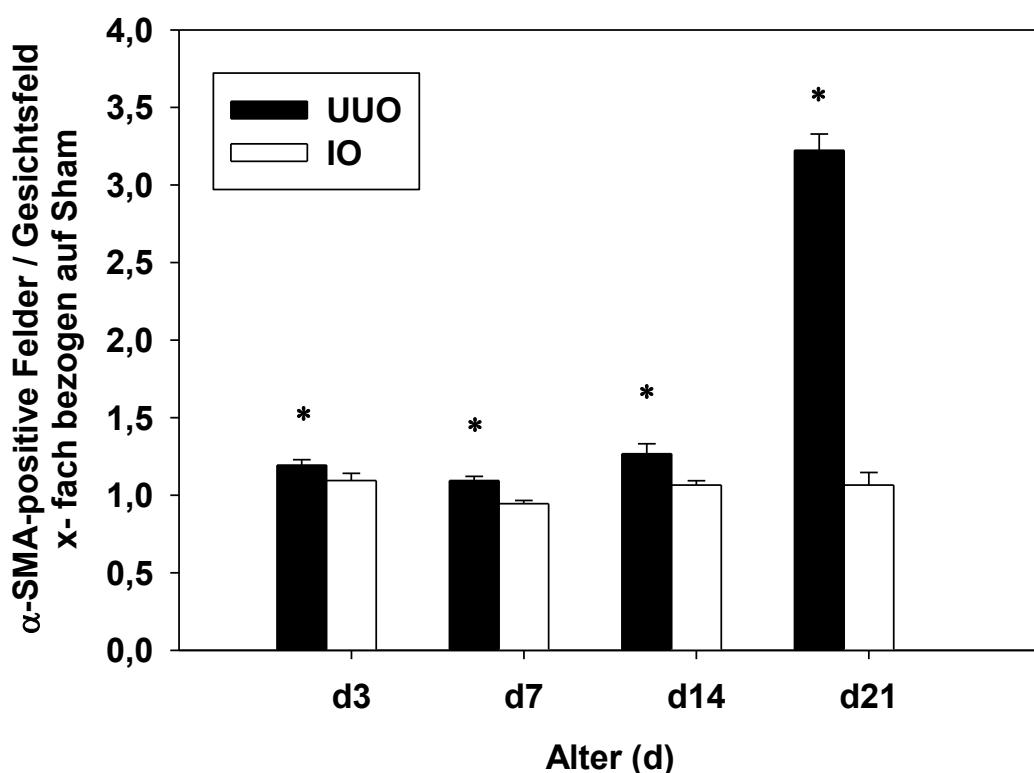


Abbildung 14: Morphometrische Analyse der Myofibroblasten-positiven Felder (α -SMA-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen Nieren (IO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); $n=8$ pro Gruppe; MW \pm SE; * $p<0,05$ UUO vs Sham

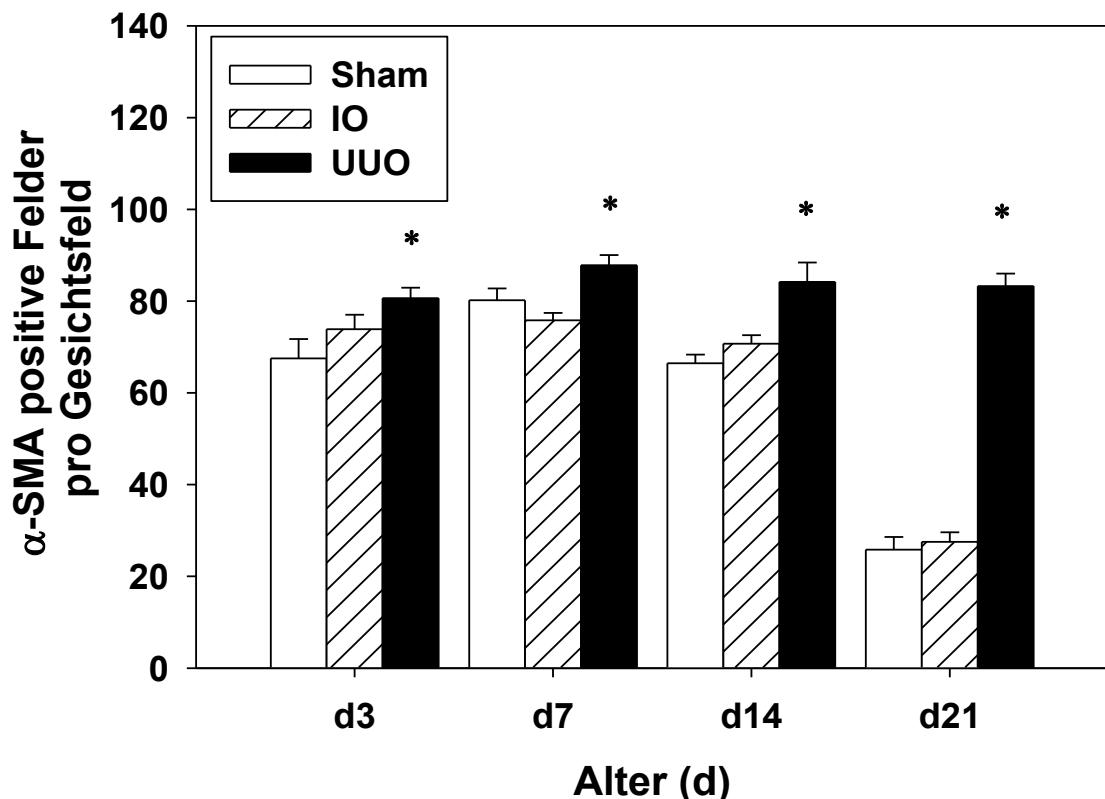


Abbildung 15: Morphometrische Analyse der Myofibroblasten-positiven Felder (α -SMA-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO), kontralateralen (IO) und scheinoperierten (Sham) Nieren neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

Die unilaterale Ureterligatur führte zu einer progradienten und statistisch signifikanten Ablagerung extrazellulärer Matrix (Kollagen-Fasern) als Marker interstitieller Fibrose in den neonatalen Nieren. Am 3. Lebenstag konnte eine 1,5-fache Zunahme Kollagen-positiver Felder pro Gesichtsfeld in den ureterligierten Nieren (UUO $5,96 \pm 1,75$ versus Sham $2,49 \pm 0,87$; p<0,001) gemessen werden. Am 7. Lebenstag zeigte sich eine 2,7-fache Zunahme der Kollagenfasern in den ureterligierten Nieren ($13,9 \pm 2,02$ Kollagen-positive Felder pro Gesichtsfeld in UUO versus $5,09 \pm 1,30$ in Sham; p<0,001), am 14. Lebenstag eine 5,6-fache Zunahme ($38,4 \pm 15,6$ versus $6,89 \pm 1,69$; p<0,001) und am 21. Lebenstag eine 11,4-fache Zunahme der Kollagenablagerungen in der UUO-Niere ($57,4 \pm 11,3$ versus $5,04 \pm 1,24$; p<0,001) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. In den Nieren der kontralateralen Gegenseite konnte keine Veränderung der Kollagenablagerung detektiert werden.

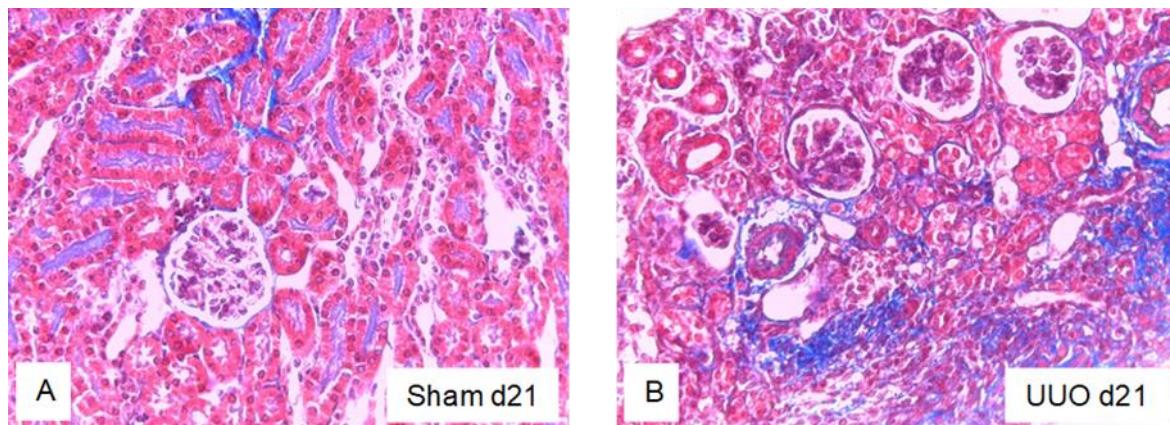


Abbildung 16: Masson-Trichrome-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO) x 400

	UUO	IO	Sham
3. Lebenstag	5,96 ± 1,75	3,09 ± 1,70	2,49 ± 0,87
7. Lebenstag	13,9 ± 2,02	4,82 ± 2,16	5,09 ± 1,30
14. Lebenstag	38,4 ± 15,6	5,69 ± 1,98	6,89 ± 1,69
21. Lebenstag	57,4 ± 11,3	5,19 ± 1,35	5,04 ± 1,24

Tabelle 11: Kollagen-positive Felder (Masson-Trichrome-Färbung) pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren der scheinoperierten Kontrollen (Sham)

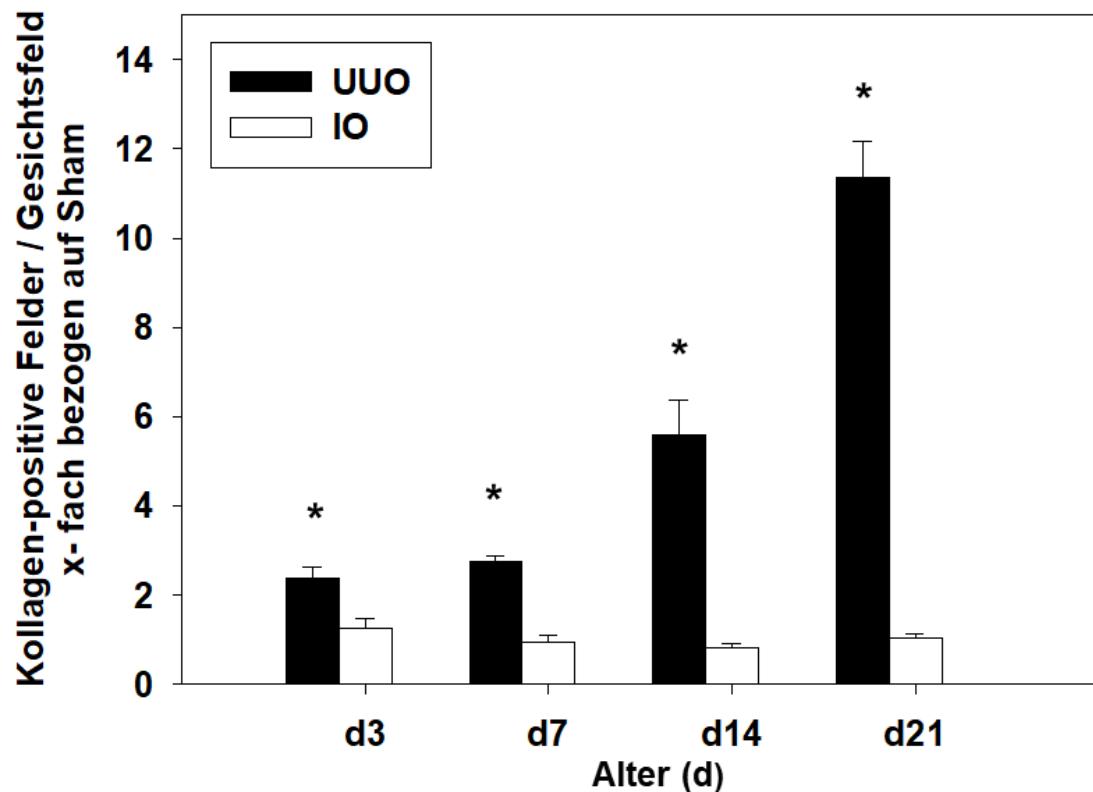


Abbildung 17: Morphometrische Analyse Kollagen-positiver Felder (Masson-Trichrome-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen Nieren (IO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

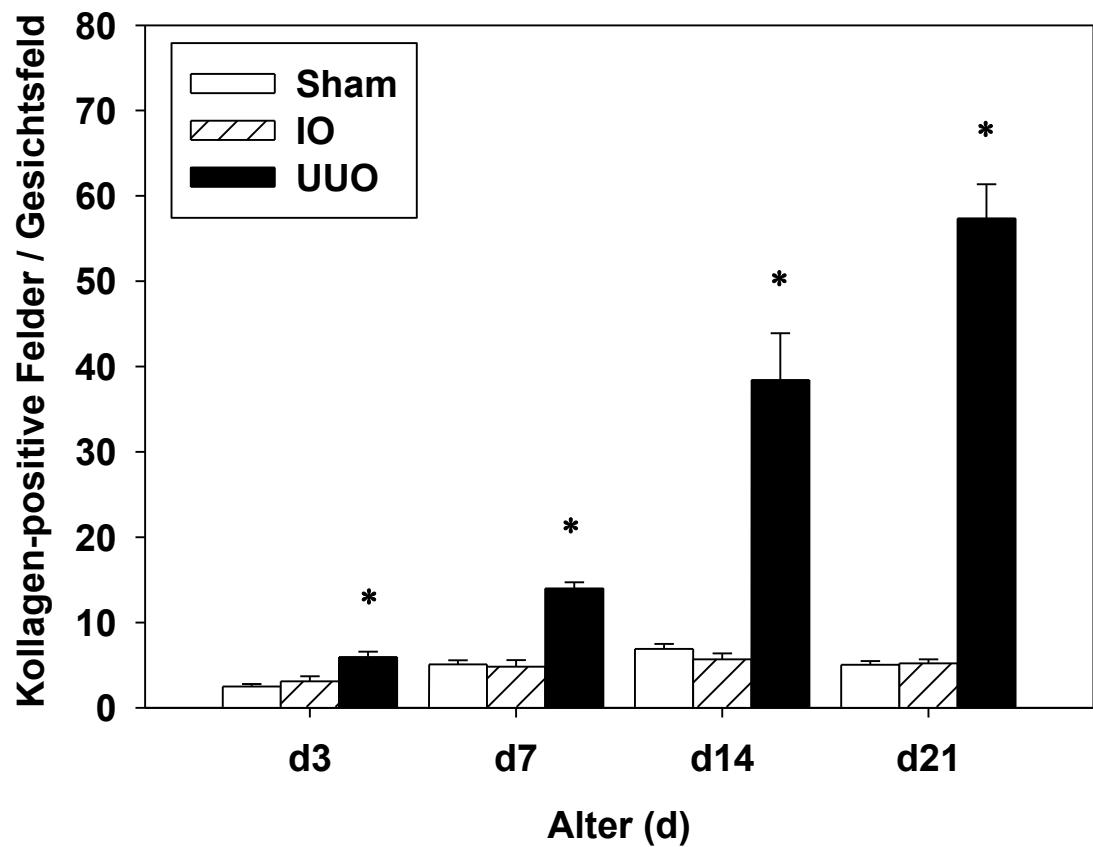


Abbildung 18: Morphometrische Analyse Kollagen-positiver Felder (Masson Trichrome-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO), kontralateralen (IO) und scheinoperierten (Sham) Nieren neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

3.7 Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die tubuläre Atrophie

Die Entwicklung tubulärer Atrophie nach unilateraler Ureterligatur wurde mittels PAS-Färbung beurteilt (Abb. 19). Die Auswertung tubulärer Atrophie erfolgte hierbei durch die Beurteilung von Veränderungen der gefärbten tubulären Basalmembran. Hierzu zählten Verdickung (*thickening*), Zerfaserung (*duplication*), Wellenbildung (*wrinkling*) und Verdünnung (*thinning*). In Tabelle 12 sind die atrophierten proximalen und distalen Tubuli in den ureterligierten Nieren (UUO), den kontralateralen Nieren (IO) und den scheinoperierten Nieren (Sham) als Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Auswertung der proximalen und distalen tubulären Atrophie in den ureterligierten Nieren stellt Abbildung 20 graphisch dar. Die Werte konnten hierbei nicht auf die scheinoperierte Kontrolle bezogen werden, da in dieser Gruppe keine Tubulusatrophie nachgewiesen werden konnte, und sind daher als Mittelwerte in 20 Gesichtsfeldern angegeben.

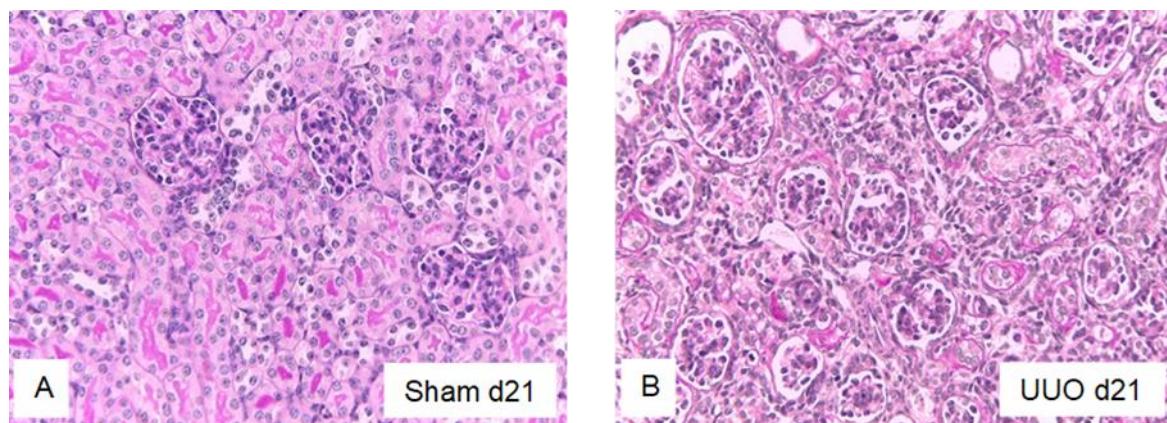


Abbildung 19: PAS-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO) x 400

Die unilaterale Ureterligatur induzierte eine progrediente Atrophie proximaler und distaler Tubuli in der neonatalen Mausniere. Proximale Tubuli waren von der Atrophie stärker betroffen als distale Tubuli. Am 3. Lebenstag waren in den ureterligierten Nieren $0,57 \pm 1,13$ proximale Tubuli atrophiert, während in der scheinoperierten Kontrollgruppe keine atrophierten Tubuli nachzuweisen waren. Am 7. Lebenstag zeigte sich bereits eine Zunahme auf $26,8 \pm 9,81$ atrophierte proximale Tubuli versus $0,00 \pm 0,00$ in der scheinoperierten Kontrolle, am 14. Lebenstag ein Anstieg auf $48,1 \pm 16,2$ versus $0,00 \pm 0,00$ und am 21. Lebenstag ein Anstieg auf $139,1 \pm 35,9$ versus $0,00 \pm 0,00$. Die Zunahme atrophiierter distaler Tubuli in den ureterligierten Nieren betrug am 3. Lebenstag $0,83 \pm 1,08$ versus $0,00 \pm 0,00$, am 7. Lebenstag $8,30 \pm 3,49$ versus $0,00 \pm 0,00$, am 14. Lebenstag $17,4 \pm 13,8$ versus $0,00 \pm 0,00$ und am 21. Lebenstag $22,4 \pm 5,90$ versus $0,00 \pm 0,00$ in den scheinoperierten Nieren.

Die Zunahme proximaler tubulärer Atrophie war im zeitlichen Verlauf statistisch signifikant (UUO d3 proximal $0,57 \pm 1,13$ versus UUO d7 proximal $26,8 \pm 9,81$; $p < 0,001$; UUO d7 proximal $26,8 \pm 9,81$ versus UUO d14 proximal $48,1 \pm 16,2$; $p < 0,05$; UUO d14 proximal $48,1 \pm 16,2$ versus UUO d21 proximal $139,1 \pm 35,9$; $p < 0,001$). Die Zunahme der Anzahl atrophierter distaler Tubuli war vom 3. auf den 7. Lebenstag und vom 7. auf den 14. Lebenstag statistisch signifikant (UUO d3 distal $0,38 \pm 1,08$ versus UUO d7 distal $8,30 \pm 3,49$; $p < 0,001$; UUO d7 distal $8,30 \pm 3,49$ versus UUO d14 distal $17,4 \pm 13,8$; $p < 0,05$; UUO d14 distal $17,4 \pm 13,8$ versus UUO d21 distal $22,4 \pm 5,90$). Diese Ergebnisse werden in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

Die Zunahme tubulärer Atrophie war in den proximalen Tubuli stärker ausgeprägt als in den distalen Tubuli ureterligierter Nieren. Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,5-facher Anstieg in den proximalen Tubuli im Vergleich zu den distalen Tubuli der ureterligierten Nieren (UUO proximal $0,57 \pm 1,13$ versus UUO distal $0,38 \pm 1,08$), am 7. Lebenstag ein 3,2-facher Anstieg (UUO proximal $26,8 \pm 9,81$ versus UUO distal $8,30 \pm 3,49$), am 14. Lebenstag ein 2,8-facher Anstieg (UUO proximal $48,1 \pm 16,2$ versus UUO distal $17,4 \pm 13,8$) und am 21. Lebenstag ein 6,2-facher Anstieg (UUO proximal $139,1 \pm 35,9$ versus UUO distal $22,4 \pm 5,90$).

	UUO		IO		Sham	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
3. LT	$0,57 \pm 1,13$	$0,38 \pm 1,08$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$
7. LT	$26,8 \pm 9,81$	$8,30 \pm 3,49$	$0,50 \pm$ 1,41	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$
14. LT	$48,1 \pm 16,2$	$17,4 \pm 13,8$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$
21. LT	$139,1 \pm 35,9$	$22,4 \pm 5,90$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$	$0,00 \pm 0$

Tabelle 12: Tubuläre Atrophie in proximalen und distalen Tubuli (PAS-Färbung) als Mittelwerte \pm Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham)

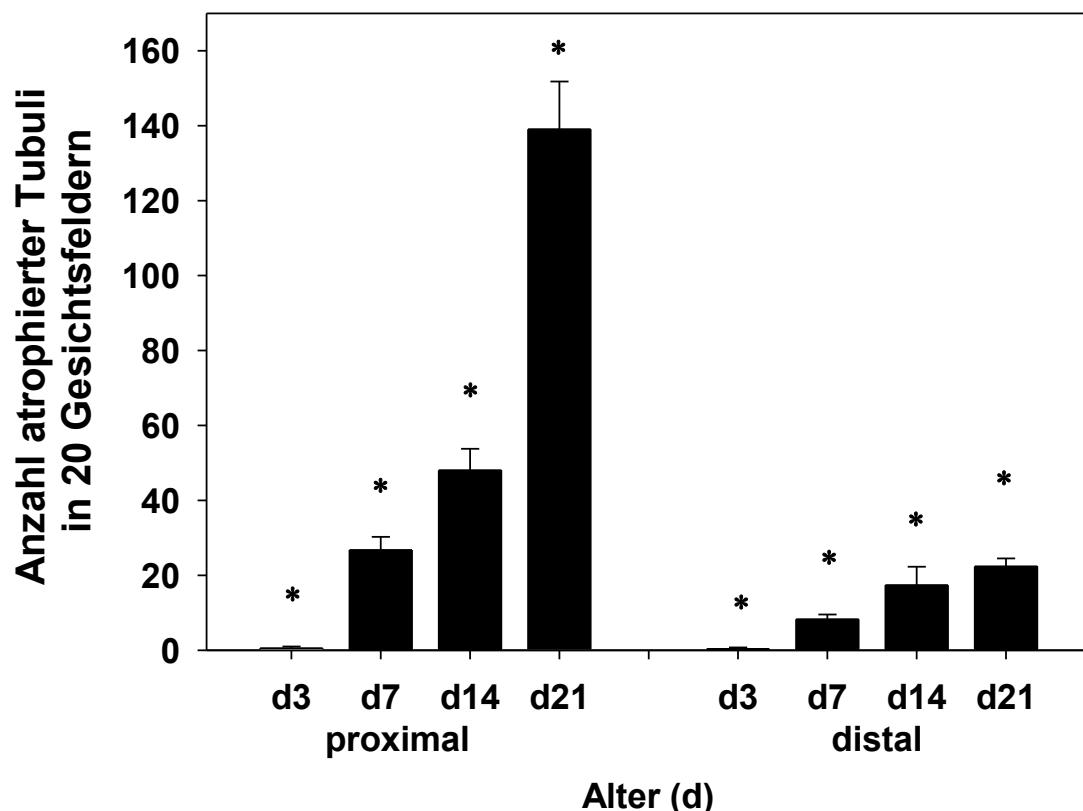


Abbildung 20: Morphometrische Analyse atrophierter proximaler und distaler Tubuli (PAS-Färbung) in 20 Gesichtsfeldern in den ureterligierten Nieren (UUO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham

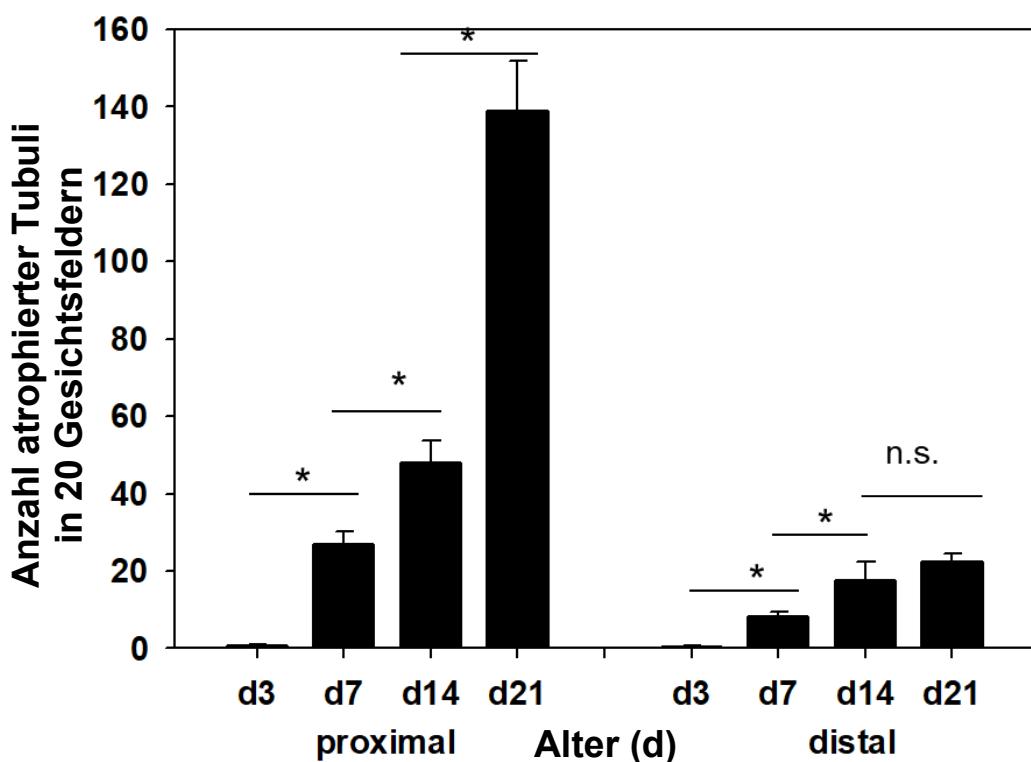


Abbildung 21: Morphometrische Analyse atrophierter proximaler und distaler Tubuli (PAS-Färbung) in 20 Gesichtsfeldern in den ureterligierten Nieren (UUO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05

3.8 Western Blots

3.8.1 Nachweis der Galectin-3-Expression in der neonatalen UUO-Niere

Zusätzlich zum immunhistochemischen Kompartiment-spezifischen Nachweis von Galectin-3 in der Niere (siehe 3.3) wurde auch mittels Western Blot die Galectin-3 Expression als M2-Makrophagenmarker in der neonatalen Mausniere nach unilateraler Ureterligatur, bzw. Scheinoperation detektiert. Hierbei zeigte sich am 3. und am 7. Lebenstag keine Änderung der Galectin-3-Expression in den UUO-Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe. Am 14. Lebenstag und 21. Lebenstag konnte eine signifikante Zunahme der Galectin-3-Expression in den UUO-Nieren nachgewiesen werden. So zeigte sich am 14. Lebenstag eine 4,5-fache Zunahme und am 21. Lebenstag eine 19,8-fache Zunahme der Galectin-3-Expression in den UUO-Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die Normierung der Expression erfolgte auf GAPDH.

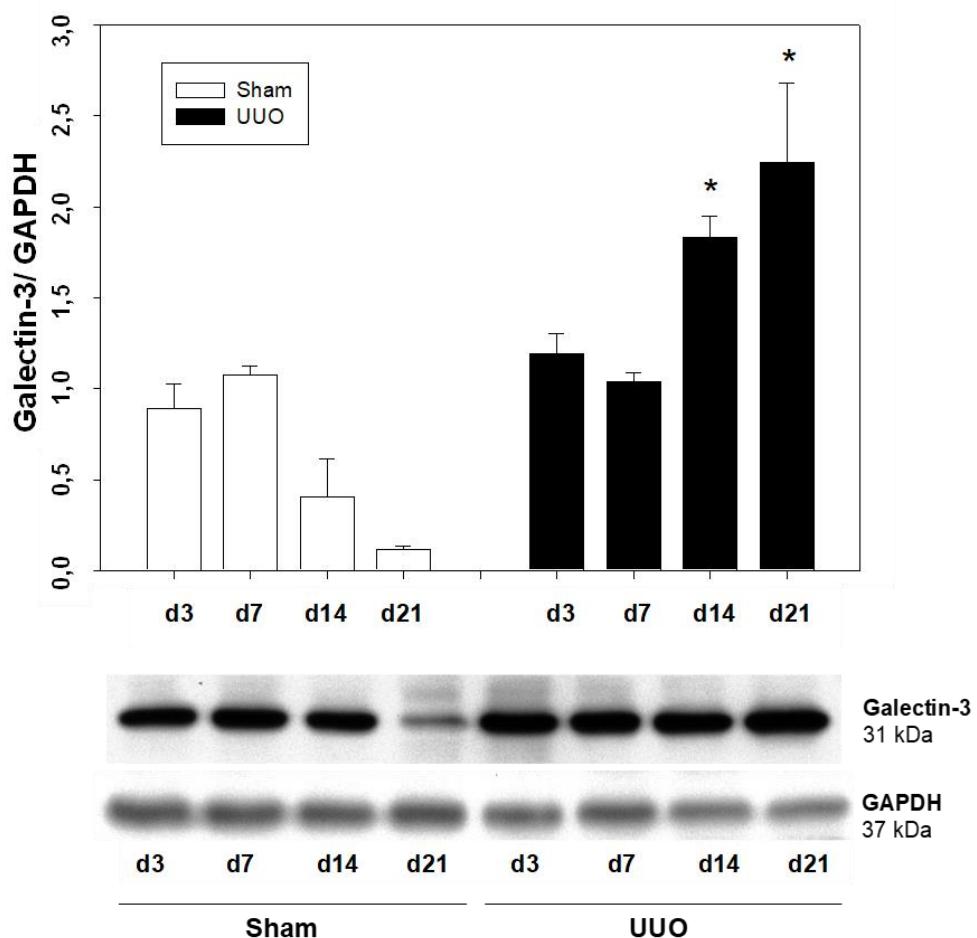


Abbildung 22: Galectin-3-Expression in ureterligierten Nieren (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham

In Abbildung 22 wird die mittels Western Blot detektierte Galectin-3-Expression der ureterligierten Nieren (UUO) und der scheinoperierten Nieren (Sham) graphisch dargestellt und die Banden des Blots eines exemplarischen Kollektivs (Antikörper und Ladungskontrolle) abgebildet.

3.8.2 Nachweis der Caspase-8-Expression in der neonatalen Niere

Ergänzend zum Nachweis apoptotischer Zellen durch die Detektion der DNA-Fragmentierung im Zellkern (TUNEL-Assay) wurde die Apoptose in der neonatalen Mausniere mittels Caspase-8-Expression im Western Blot untersucht. Die durch Dimerisierung und mehrfache Spaltung aktivierte Caspase-8 initiiert dabei den programmierten Zelltod durch Einleitung der Apoptose-

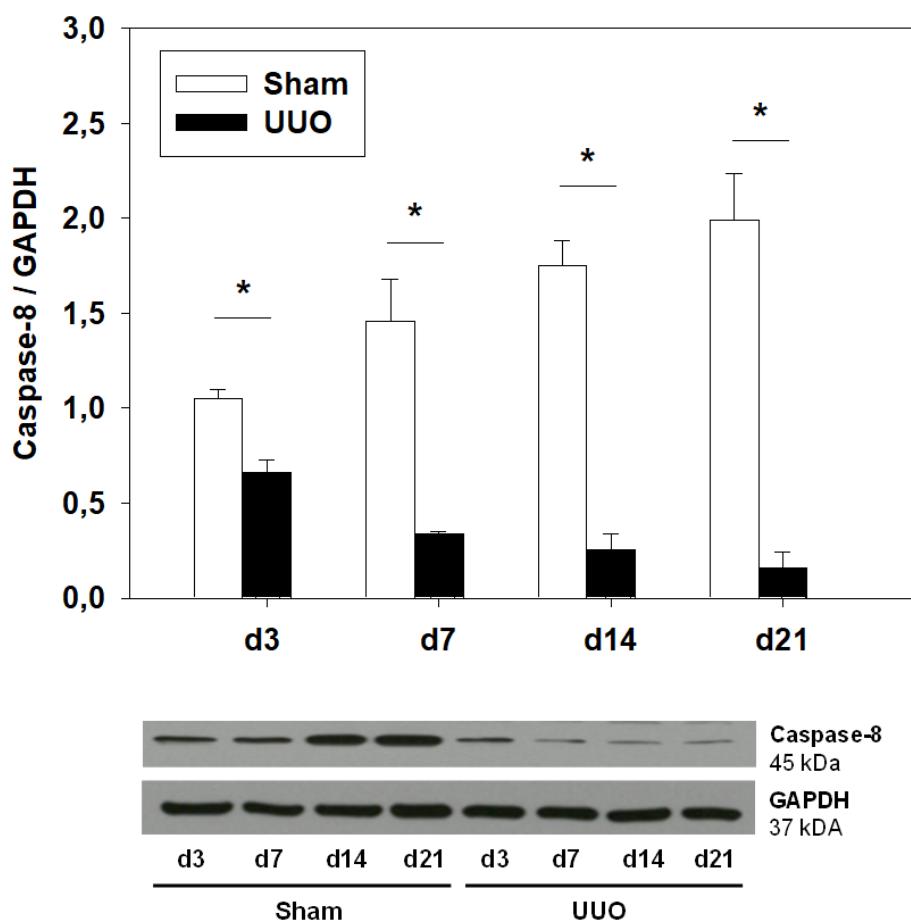


Abbildung 23: Expression von Caspase-8 in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham

Kaskade über Spaltung von Caspase-3 und Caspase-7 [87, 88]. Somit kommt es bei vermehrter Apoptose zu einer Reduktion der Caspase-8-Expression (sogenannte Pro-Caspase) und einem Anstieg der aktivierte, gespaltenen Form [87]. In dieser Arbeit wurde die inaktive Form der Caspase-8 untersucht. Hierbei zeigte sich eine kontinuierliche und

signifikante Abnahme der Caspase-8-Expression als Zeichen vermehrter Apoptose-Aktivität in den ureterligierten Nieren im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Am 3. Lebenstag war die Caspase-8-Expression in den ureterligierten Nieren verglichen mit den scheinoperierten Nieren um 38%, am 7. Lebenstag um 77%, am 14. Lebenstag um 85% und am 21. Lebenstag um 92% reduziert. Es zeigte sich zu allen vier Zeitpunkten eine statistisch signifikante Reduktion der Caspase-8-Expression. Die Normierung der Daten erfolgte durch Bezug auf die GAPDH-Expression. In Abbildung 23 ist die Auswertung der Caspase-8-Expression in der neonatalen Niere graphisch dargestellt und um ein exemplarisches Bild des Western Blots (Antikörper und Ladungskontrolle) ergänzt.

Diese Ergebnisse wurden bereits vorab publiziert [86].

3.8.3 Nachweis der α -SMA-Expression in der neonatalen Niere

Neben dem immunhistochemischen Nachweis von α -SMA als Myofibroblastenmarker (siehe 3.6) erfolgte zusätzlich der Nachweis von α -SMA mittels Western Blot nach unilateraler Ureterligatur bzw. Scheinoperation in der neonatalen Mausniere. Die Ergebnisse der Expression sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt und werden nachfolgend erläutert. Am 3. Lebenstag und am 7. Lebenstag konnte in den UUO-Nieren jeweils eine 1,5-fache Zunahme der α -SMA-Expression im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle gemessen werden. Am 14. Lebenstag zeigte sich die maximale α -SMA-Expression in den ureterligierten Nieren. Verglichen mit den scheinoperierten Nieren konnte eine 2,5-fache Zunahme der α -SMA-Expression nach UUO am 14.LT nachgewiesen werden. Am 21. Lebenstag zeigte sich eine 3,4-fache Zunahme der α -SMA-Expression in den UUO-Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Diese Zunahme der α -SMA Expression war zu allen vier Zeitpunkten in den ureterligierten Nieren statistisch signifikant. Die Normierung der Banden erfolgte bezogen auf GAPDH. Somit konnte eine kontinuierliche Zunahme aktiver Myofibroblasten in der Niere im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie nachgewiesen werden (Abb. 24).

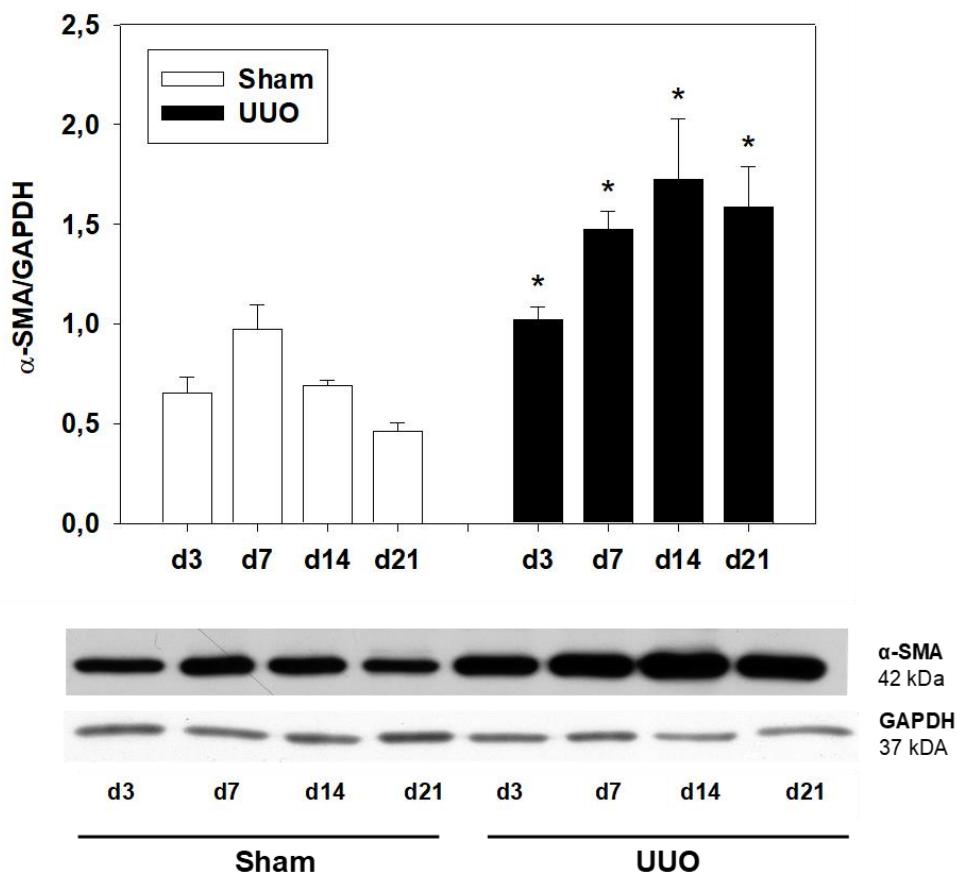


Abbildung 24: Expression von α -SMA in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham

3.8.4 Nachweis der PDGFR- β -Expression in der neonatalen Niere

Ergänzend zu den immunhistochemischen Untersuchungen der renalen Fibrosierung und Myofibroblastenaktivierung nach UUO (siehe 3.6), wurde auch die Expression des PDGF/PDGFR-Systems mittels Western Blotting untersucht. Das *Platelet-derived growth factor / platelet-derived growth factor receptor*- (PDGF/PDGFR)- System ist ein Liganden-Rezeptor-System, welches u.a. eine bedeutende Rolle in der Nierenentwicklung und bei verschiedenen (patho-)physiologischen renalen Prozessen wie Zellmigration und auch bei der Bildung und Ablagerung extrazellulärer Matrix spielt [89, 90]. Der *Platelet-derived growth factor*-Rezeptor- β (PDGFR- β) ist eine Rezeptorkette des PDGF/PDGFR-Systems und vermittelt über die Bindung der entsprechenden Liganden profibrotische Signalkaskaden, welche an der renalen Fibrosierung beteiligt sind [89-91]. PDGFR- β wird von Perizyten exprimiert und dient als etablierter Marker dieser Zellen [85, 92, 93]. Perizyten migrieren ins Interstitium und sind über die Differenzierung zu aktivierten Myofibroblasten an der Entstehung renaler interstitieller Fibrose beteiligt [83, 84, 93, 94]. Der Nachweis von PDGFR- β erfolgte mittels Western Blot. Hierbei zeigte sich am 3. Lebenstag und 7. Lebenstag kein Unterschied in der PDGFR- β -

Expression in den neonatalen Nieren. Am 14. Lebenstag konnte jedoch eine 1,6-fache Zunahme der PDGFR- β -Expression nach unilateraler Ureterligatur im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich am 21. Lebenstag noch deutlicher mit einem 2,7-fachen Anstieg der PDGFR- β -Expression in den ureterligierten Nieren. Diese Zunahme der PDGFR- β -Expression in den UUO-Nieren war am 14. und 21. Lebenstag statistisch signifikant und ist in Abbildung 25 graphisch dargestellt. Die Normierung der Banden erfolgte bezogen auf GAPDH. Somit konnte eine durch die unilaterale Ureterligatur induzierte Hochregulierung von PDGF-Rezeptor- β in den neonatalen Nieren nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass Perizyten und das PDGF/PDGFR-System an der Entwicklung interstitieller Fibrose nach UUO beteiligt sind.

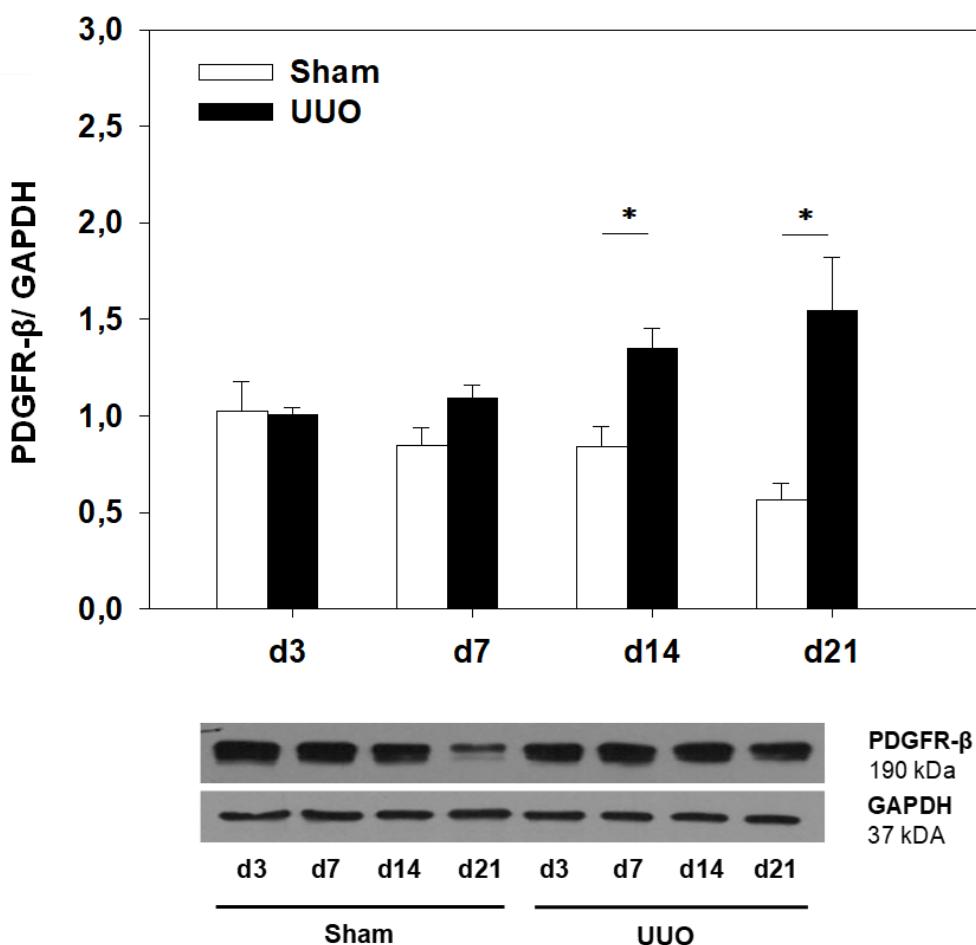


Abbildung 25: Expression von PDGFR- β in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von Inflammation und Fibrose im neonatalen Mausmodell der unilateralen Ureterligatur (UUO) untersucht. Das neonatale UUO-Modell ist ein etabliertes experimentelles Modell, um die Pathophysiologie konnataler obstruktiver Uropathien und dabei insbesondere der ureteropelvinen Stenose zu studieren. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unilaterale Ureterligatur zu einer massiven Leukozyteninfiltration mit T-Lymphozyten und sogenannten M2-Makrophagen in der neonatalen Mausniere führt. Die lokale Proliferation der infiltrierenden Leukozyten war vergleichsweise gering, so dass hier der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem eine entscheidende Rolle zukommt. Darüber hinaus induzierte die unilaterale Ureterligatur renale Apoptose, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel detailliert dargelegt, erläutert und anhand der bisher publizierten Daten diskutiert.

4.1 T-Lymphozyteninfiltration

Infolge der unilateralen Ureterligatur, die am 2. Lebenstag der Maus durchgeführt wurde, kommt es zu einer Einwanderung von CD3-positiven T-Lymphozyten aus dem Blutgefäßsystem in die neonatale Niere. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es bis zum 21. LT in der neonatalen Maus zu einer kontinuierlichen und signifikanten Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten in der ureterligierten Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle kommt. Diese Ergebnisse passen zu den bereits publizierten Daten aus UUO-Modellen an adulten und neonatalen Mäusen [80, 95-98]. Hierbei zeigte sich in den zitierten Arbeiten ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg der T-Lymphozyteninfiltration in der UUO-Niere. Vielhauer et al. und Anders et al. konnten in adulten Mäusen mit UUO zeigen, dass 6 und 10 Tage nach unilateraler Ureterligatur eine Zunahme der T-Lymphozyten in der adulten Mausniere nachweisbar ist [97, 99]. Publikationen unserer Arbeitsgruppe zeigten im neonatalen Tiermodell der UUO ebenfalls eine signifikante Zunahme CD3-positiver T-Lymphozyten am 7. und 14. Lebenstag, was dem 5. und 12. postoperativen Tag nach unilateraler Ureterligatur entspricht [80, 95, 96, 98, 100]. Vergleichbare Studien, die den Verlauf der T-Lymphozyteninfiltration über einen Zeitraum von 21 Tagen nach neonataler UUO verfolgen, liegen nicht vor. Diese lang andauernde Infiltration mit T-Lymphozyten bei der neonatalen Maus könnte Folge einer kontinuierlich stimulierten Rekrutierung von T-Lymphozyten aus der Blutbahn in die Niere infolge der obstruktiven Uropathie sein oder auch durch Proliferation von T-Lymphozyten in situ in der Niere entstehen.

Bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutgefäßsystem spielen Adhäsionsmoleküle und Chemokine eine entscheidende Rolle. Vielhauer et al. untersuchten die Expression von CC-Chemokinen, kleinen chemotaktischen Zytokinen, und CC-Chemokin-Rezeptoren nach unilateraler Ureterligatur in adulten Mäusen. Die Autoren konnten zeigen, dass es nach unilateraler Ureterobstruktion zu einer gesteigerten Expression der CC-Chemokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und RANTES (*Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) sowie auch der Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 kommt [97]. Durch *in situ*-Hybridisierung konnten MCP-1 und RANTES in interstitiellen mononukleären Zellinfiltraten und tubulären Epithelzellen lokalisiert werden. Das bedeutet, dass sowohl Leukozyten als auch Nierenepithelzellen infolge der Ureterobstruktion chemotaktische Signale ausschütten und die Infiltration der Chemokin-Rezeptor-tragenden Zellen (Leukozyten) auslösen. Während Makrophagen hauptsächlich CCR2 und CCR5 exprimieren, zeigen T-Lymphozyten eine Hochregulation von CCR5 nach UUO [97]. In der Folge wurden auch therapeutische Chemokin-Rezeptor-Blockaden tierexperimentell untersucht. So konnte unsere Arbeitsgruppe im neonatalen UUO-Modell zeigen, dass eine Behandlung mit dem selektiven Chemokin-Rezeptor-1-Antagonisten BX471 zur Reduktion infiltrierender T-Lymphozyten am 7. und 14. Lebenstag führt [96]. Infolge der Therapie waren auch die Apoptose tubulärer Zellen und die interstitielle Fibrose in der neonatalen Niere signifikant reduziert [96]. Chemokine und ihre Rezeptoren sind daher maßgeblich an der Rekrutierung und Infiltration von Leukozyten beteiligt, was durch zahlreiche Studien mit neutralisierenden Antikörpern und Chemokin-Rezeptorantagonisten belegt ist [101-103].

Der Nachweis der T-Lymphozyten-Infiltration in der neonatalen UUO-Niere führt zu einer weiteren Frage. Welche Rolle spielen diese Immunzellen bei der obstruktiven Uropathie? Sind T-Lymphozyten u.a. auch an der Entstehung interstitieller Fibrose in der Niere beteiligt?

T-Lymphozyten sind an der Entwicklung interstitieller Fibrose bei obstruktiven Uropathien beteiligt. So konnten Tapmeier et al. zeigen, dass CD4+-Lymphozyten die Entwicklung tubulointerstitieller Fibrose nach UUO vermitteln [104]. Die Autoren wiesen nach Depletion von CD4+-Lymphozyten bei gleichbleibender Makrophagenanzahl 14 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion eine reduzierte Kollagenablagerung in der Niere nach [104]. In einem weiteren Schritt wurden lymphopene RAG (*recombination activation gene-1*)-Knockout-Mäuse vor der unilateralen Ureterligatur entweder mit CD4+-Lymphozyten oder CD8+-Lymphozyten rekonstitutioniert und die renale Fibrose nach UUO gemessen. Dabei zeigten lediglich die mit CD4+-Lymphozyten rekonstitutionierten Mäuse die Entwicklung einer renalen Fibrose, nicht aber die mit CD8+-Lymphozyten rekonstitutionierten Mäuse [104]. Die Autoren folgerten daraus, dass nur CD4+-Lymphozyten die Entstehung tubulointerstitieller Fibrose nach UUO vermitteln [104]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Liu et al., die die Entwicklung renaler Fibrose nach UUO bei CD4+-Lymphozyten-depletierten adulten Mäusen untersuchten [105]. Die

Autoren wiesen eine signifikante Reduktion interstitieller Fibrose in CD4+-Lymphozyten-depletierten adulten Mäusen mit UUO im Vergleich zum Wildtyp nach [105]. Die CD4+-Lymphozyten-Depletion führte in dieser Studie jedoch nicht zu einer kompletten Reduktion der UUO-induzierten Fibrose, sondern nur zu einer partiellen [105]. Anschließend führten die Autoren noch eine Differenzierung der Lymphozytenpopulation durch und konnten eine Zunahme der TH2/TH1-Ratio in der UUO-Niere nachweisen, was auf einen TH2-dominanten Einfluss bei der Entwicklung renaler Fibrose hindeutet [105]. Diese Vermutung wurde durch Rekonstitution der TH1- bzw. TH2-Lymphozyten in T-Lymphozyten-defizienten Knockout-Mäusen bestätigt [105]. So zeigte sich in den Nieren der TH2-rekonstituierten Mäuse nach UUO sowohl eine Zunahme der renalen Fibrose als auch eine stärkere Expression des Myofibroblastenmarkers α -SMA [105]. Auch die Expression von Vimentin, Fibronectin, TGF- β und Kollagen I war in den TH2-rekonstituierten Mäusen mit UUO stärker als in den TH1-rekonstitutionierten Mäusen [105].

Wie können diese T-Lymphozyten renale Fibrose vermitteln? Welche direkten oder indirekten profibrotischen Effekte lösen sie nach unilateraler Ureterligatur aus? Naheliegend scheint es, dass dieser profibrotische Effekt von T-Lymphozyten durch die Sekretion von Zytokinen vermittelt wird. So sezernieren TH2-Zellen die Zytokine IL-4 und IL-13, die wiederum die Rekrutierung von profibrotischen M2-Makrophagen induzieren [106, 107]. TH1-Zellen hingegen aktivieren über die Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) M1-Makrophagen und wirken damit pro-inflammatorisch [105, 107, 108]. Neben der Zytokinausschüttung sind T-Lymphozyten aber auch in der Lage, über die Aktivierung von Signalwegen, - unter anderem des JAK/STAT-Signalwegs -, die Fibrosierung verschiedener Organe zu stimulieren [106, 107]. Zusammenfassend sind damit sowohl direkte als auch indirekte Effekte von T-Lymphozyten an der Entwicklung renaler Fibrose beteiligt.

4.2 Makrophageninfiltration

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion nach unilateraler Ureterligatur. Sie wandern nach UUO im Rahmen der Leukozytenrekrutierung als Monozyten aus der Blutbahn in die Niere ein und werden dann in der Niere als Makrophagen bezeichnet. Darüber hinaus gibt es aber auch gewebsständige Makrophagen in der Niere. Aufgrund ihrer Heterogenität und Vielseitigkeit stellen Makrophagen eine interessante Zellpopulation dar [78, 79, 109, 110]. In verschiedenen Publikationen, u.a. auch von unserer Arbeitsgruppe, konnte nach UUO eine massive Infiltration von F4/80-positiven Makrophagen in die Niere nachgewiesen werden [80, 82, 96]. Aufgrund ihrer Heterogenität und Plastizität und vor allem

aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen ist eine genauere Betrachtung der Makrophagen-Subtypen bei UUO wichtig [108, 111].

Funktionell können grob zwei Makrophagen-Phänotypen unterschieden werden: klassisch-aktivierte M1-Makrophagen und alternativ-aktivierte M2-Makrophagen, welche konträre und komplementäre Funktionen bei Inflammation, Wundheilung und Umbauprozessen im Gewebe ausüben [108, 111, 112]. Während M1-Makrophagen eine pro-inflammatorische und antifibrotische Wirkung zeigen, weisen M2-Makrophagen eine profibrotische und anti-inflammatorische Wirkung auf. M1-Makrophagen können antimikrobiell, zytotoxisch, pro-inflammatorisch und antifibrotisch wirken, indem sie durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen wie TNF- α und Stickstoffmonoxid (NO) Apoptose und Phagozytose induzieren und durch die Sekretion antifibrotischer Signale wie den Matrix-Metalloproteasen (MMPs) den Abbau extrazellulärer Matrix fördern und Fibrose reduzieren [83, 108, 111, 113, 114]. Aktiviert werden M1-Makrophagen durch von TH1-Zellen ausgeschüttetes IFN- γ , durch bakterielle Zellwandbestandteile und Matrixbestandteile [108]. M2-Makrophagen hingegen zeigen eine profibrotische und anti-inflammatorische Wirkung. Sie werden durch von TH2-Zellen ausgeschüttete Interferone (IL-4, IL-10, IL-13) und TGF- β_1 aktiviert und wirken durch die Ausschüttung von TGF- β_1 und Galectin-3 profibrotisch und anti-inflammatorisch, indem sie Myofibroblasten aktivieren und durch die Ablagerung extrazellulärer Matrix die Wundheilung fördern [107, 108, 111]. Galectin-3 ist ein β -Galactosid-bindendes Lektin, das von M2-Makrophagen sezerniert und exprimiert wird [115]. Galectin-3 kann als immunhistochemischer Marker für M2-Makrophagen verwendet werden.

Wie kommt es zur Differenzierung in diese unterschiedlichen M1- und M2-Makrophagen-Subtypen? Infolge der unilateralen Ureterligatur werden aus dem Knochenmark freigesetzte Monozyten im Rahmen der sogenannten Leukozytenrekrutierung aus der Blutbahn in die ureterligierte Niere rekrutiert [107]. In der frühen Phase der Nierenschädigung differenzieren diese eingewanderten Monozyten/Makrophagen getriggert durch PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) und DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) oder durch Zytokine zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen. Als M1-Makrophagen sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine, induzieren programmierten Zelltod und Phagozytose und reduzieren Fibrose durch den Abbau extrazellulärer Matrix [83, 107, 108, 111, 113, 116]. Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion in der Niere können diese M1-Makrophagen dann durch verschiedene anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- β_1 zu M2-Makrophagen differenzieren [107, 108, 111, 116]. Weitere, vorwiegend FACS-basierte Differenzierungen orientieren sich an der prädominanten Rolle der Makrophagensubtypen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Nierenschädigung und klassifizieren anhand der Oberflächenmarker in anti-inflammatorische M2c-Makrophagen, profibrotische M2a-Makrophagen und fibrolytische Makrophagen [116]. Die entsprechenden

Oberflächenmarker auf murinen Makrophagen sind CD11b, F4/80, CD68, Ly6C, CCR2, CX3CR1, MHCII, CD16/32 oder CD206 [107, 116]. Auf diese FACS-basierte Makrophagen-Klassifizierung wird in späteren Abschnitten der Diskussion eingegangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, u.a. erstmals M2-Makrophagen in der neonatalen Niere nach unilateraler Ureterligatur nachzuweisen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen von 3 µm Nierenschnitten und Western Blotting Methoden durchgeführt, um die Galectin 3-Proteinexpression in der neonatalen Niere zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die unilaterale Ureterligatur zur Zunahme interstitieller Galectin-3 positiver M2-Makrophagen in der Niere führt. Im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle kam es zu einer signifikanten Zunahme interstitieller M2-Makrophagen in der neonatalen UUO-Niere am 14. und 21. Lebenstag der Maus, was dem 12., bzw. 19. postoperativen Tag nach UUO entspricht. Infolge der Ureterobstruktion war in den neonatalen Mausnieren am 14. Lebenstag eine 11-fache Zunahme Galectin-3 positiver Makrophagen und am 21. Lebenstag eine 23-fache Zunahme im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle nachweisbar. Parallel zu dieser immunhistochemischen Galectin-3 Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Proteinexpression von Galectin-3 im Nierengewebe der neonatalen Maus mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Galectin-3-Expression am 14. und 21. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur verglichen mit den Nieren der scheinoperierten Kontrolle. Somit konnten in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemischen Daten im Western Blot bestätigt werden. Diese Ergebnisse passen zu den publizierten Daten von Henderson et al., die in adulten Mäusen zeigen konnten, dass es nach UUO zu einer signifikanten Zunahme Galectin-3 positiver Makrophagen in der Niere kommt [115]. Die Autoren führten sowohl immunhistochemische Nachweise als auch eine *real-time* PCR durch, die die Zunahme von Galectin-3 an Tag 3, 7 und 14 nach UUO im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle zeigte [115]. Henderson et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass die Depletion dieser Galectin-3 positiven M2-Makrophagen zur Reduktion tubulointerstitieller Fibrose führt, was die entscheidende profibrotische Rolle der M2-Makrophagen in diesem Prozess verdeutlicht [115]. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich im neonatalen Mausmodell zeigen, dass die unilaterale Ureterligatur eine deutliche Zunahme Galectin-3 positiver Makrophagen im Interstitium induziert und ebenfalls zu verstärkter interstitieller Fibrose führt [98]. Im Umkehrschluss dazu waren in neonatalen Knockout-Mäusen für ICAM-1/RAGE, welche als Adhäsionsmoleküle für die Leukozytenrekrutierung relevant sind, sowohl die Galectin-3 Expression als auch der Nachweis interstitieller Fibrose nach UUO im Vergleich zu Wildtypmäusen reduziert [80].

In der vorliegenden Arbeit konnte aber nicht nur im Interstitium sondern auch in den Glomeruli der ureterligierten Niere eine Zunahme Galectin-3 positiver Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Zunahme an glomerulären Makrophagen war jedoch wesentlich geringer

ausgeprägt als die interstitielle Infiltration und war in den Glomeruli auch erst am 21. Lebenstag statistisch signifikant erhöht. Wie erklärt sich dieser Anstieg von M2-Makrophagen in den Glomeruli der UUO-Niere? Die Zunahme an glomerulären Makrophagen in der UUO-Niere ist vermutlich primär auf den gesteigerten Zelltod glomerulärer Zellen zurückzuführen mit der Folge einer Zunahme phagozytierender Makrophagen. Da es infolge der Ureterligatur in der neonatalen Niere zu einer Vasokonstriktion mit Hypoxie und Ischämie kommt, ist eine deutliche Zunahme der Apoptose und Nekrose sowohl tubulärer als auch glomerulärer Zellen nachweisbar. Infolge der tubulären Apoptose entwickelt sich eine Tubulusatrophie mit Bildung sogenannter atubulärer Glomeruli und verstärkter glomerulärer Apoptose, Nekrose und Glomerulosklerose [5, 7, 75, 77]. El Nahas et al. konnten zeigen, dass es bei Tubulusatrophie zur Ausschüttung von Chemokinen, pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Endothelzellen kommt und hierdurch auch zur Einwanderung von Makrophagen in die Glomeruli [117]. Diese Zell-Zell-Interaktion von Makrophagen mit glomerulären Zellen stimuliert dabei nicht nur die Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose [117], sondern beinhaltet auch die Phagozytose von zerstörten glomerulären Zellen durch Makrophagen. Aufgrund der erst späten Zunahme glomerulärer Galectin-3 positiver Makrophagen in der neonatalen Mausniere am 21. Lebenstag scheinen M2-Makrophagen in den Glomeruli in den ersten 2 Wochen nach UUO nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, was zum Hauptschädigungsort des UUO-Modells passt, dem Tubulointerstitium. Daher handelt es sich bei den am 21. Lebenstag nachgewiesenen Galectin-3 positiven Makrophagen in den Glomeruli a.e. um Phagozyten, die dann bei im Verlauf zunehmender Glomerulosklerose stimuliert werden.

Die eingangs beschriebene Unterteilung in klassisch-aktivierte M1- und alternativ-aktivierte M2-Makrophagen ist eine gängige, jedoch auch stark vereinfachte Form zur Beschreibung der hochdiversen Makrophagenpopulation, bei der neben Oberflächenmarkern auch unterschiedliche Polarisations-Stadien eine Rolle spielen [107]. Zur Differenzierung der verschiedenen Makrophagensubtypen wurden dabei neben *single-cell*-Techniken wie der Durchflusszytometrie (FACS) auch *single-cell*-RNA-Sequenzierungen eingesetzt [107, 118].

So konnten Belliere et al. im Tiermodell der Rhabdomyolyse-induzierten Nierenschädigung bei Mäusen zeigen, dass zu Beginn der renalen Schädigung $F4/80^{\text{low}}CD11b^{\text{high}}Ly6b^{\text{high}}CD206^{\text{low}}$ M1-Makrophagen das Infiltrat in der Mausniere dominieren, während im Verlauf der Nierenschädigung vorwiegend $F4/80^{\text{high}}CD11b^{\text{+}}Ly6b^{\text{low}}CD206^{\text{high}}$ M2-Makrophagen in der Niere nachweisbar sind [119]. Ein ähnlicher Wechsel im Oberflächenprofil der Makrophagen mit Shift von M1- zu M2-Makrophagen wurde von Calle et al. 2021 publiziert, die nach UUO in der adulten Mausniere zeigen konnten, dass initial $F4/80^{\text{low}}CD11b^{\text{+}}$ Makrophagen in der UUO-Niere nachweisbar sind, die eine hohe Phagozytose-Fähigkeit aufweisen, und dass diese Makrophagensubpopulation dann im Verlauf parallel zur progredienten Fibrosebildung in der

Niere abnimmt, während die $F4/80^{\text{high}}CD11b^+$ Makrophagen-Population mit geringer Phagozytose-Fähigkeit im Verlauf zunimmt [120]. Zusätzlich entwickelte die gleiche Arbeitsgruppe mittels CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Technologie eine Makrophagen-Population, welche die für die Phagozytose relevante CP-Transferase 1a (*carnitine palmitoyl transferase 1a*) überexprimiert und damit funktionell der M1-Makrophagenpopulation entspricht [120]. Nach Infusion dieser gentherapeutisch hergestellten M1-Makrophagen konnten die Autoren in der Mausniere mit UUO eine reduzierte renale Fibrose nachweisen [120] und damit die anti-fibrotische Wirkung von M1-Makrophagen erneut belegen.

Diese publizierten Daten unterstreichen nicht nur die hier vorgestellten Ergebnisse der UUO-induzierten M2-Makrophageninfiltration in der neonatalen Niere, sondern zeigen auch mögliche zukünftige Therapie-Ansatzpunkte auf. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass Makrophagen eine altersabhängige Entwicklung und Differenzierung aufweisen. Die im adulten Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse können daher weder auf die neonatale noch auf die fetale Niere und Makrophageninfiltration direkt übertragen werden. So konnten Salei et al. erstmals zeigen, dass renale mononukleäre Phagozyten, zu denen Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen gehören, eine altersabhängige Heterogenität in der physiologischen Entwicklung zeigen [118]. Mittels FACS-Analyse wiesen die Autoren in den Nieren neugeborener Mäuse vorwiegend embryonale $MHCII^{\text{neg}}F4/80^{\text{hi}}CD11b^{\text{low}}$ Makrophagen nach, die sich von Vorläuferzellen aus dem embryonalen Dottersack ableiten und MERTK (*MER receptor tyrosine kinase*) und TIM-4 (*T cell and mucine domain containing 4*) exprimieren [118]. Diese neonatale Makrophagenpopulation wird dann einige Wochen später durch eine Population ersetzt, welche $MHCII$ exprimiert, nicht aber mehr MERTK und TIM-4 [118]. Diese Makrophagensubpopulationen unterscheiden sich auch von denen adulter Mäuse [118], was erneut auf die altersabhängige Differenzierung von Makrophagen hinweist. Darüber hinaus konnten Salei et al. zeigen, dass die Makrophagen von zwei Wochen alten Mäusen auf *Toll like receptor* (TLR)-Liganden mit einer niedrigeren *Tumor necrosis factor* (TNF)-Produktion reagieren als adulte Mäuse, was für eine geringere inflammatorische Kapazität der Makrophagen im Neugeborenenalter spricht [118].

Da sich Makrophagen zunächst aus dem embryonalen Dottersack, danach aus hämatopoetischen Stammzellen in der fetalen Leber und im Verlauf im Knochenmark entwickeln, üben diese verschiedenen Subpopulationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Abstammung wahrscheinlich auch diverse Funktionen aus [111, 112, 121, 122]. Dies verdeutlicht, dass sowohl der Ursprung der Makrophagen als auch der Zeitpunkt der Nierenschädigung und das vorherrschende Milieu in der Niere (z.B. Inflammation, Apoptose, Phagozytose, Fibrose) entscheidend für die Heterogenität der Makrophagen und ihre verschiedenen Funktionen sind [116, 118, 121].

Zusammengefasst zeigen die hier vorgelegten Daten, dass es nach unilateraler Ureterligatur im neonatalen Mausmodell zu einer signifikanten Zunahme Galectin-3-positiver M2-Makrophagen kommt. Insbesondere der deutliche Anstieg von Galectin-3-positiven Makrophagen an Tag 21 ist in der Literatur bisher nicht abgebildet, sodass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die Bedeutung dieser M2-Makrophagen in der frühen Nierenentwicklung und bei konnatalen obstruktiven Uropathien zu klären.

4.3 Proliferation

Zur Erfassung des Regenerationspotentials in der sich noch entwickelnden neonatalen Niere mit UUO wurde in der vorliegenden Arbeit die Proliferation tubulärer und glomerulärer Zellen in der neonatalen Mausniere immunhistochemisch bestimmt. Zusätzlich wurde auch die Proliferation der interstitiellen Zellen in der Niere gemessen, bei denen es sich einerseits um proliferierende renale Fibroblasten und Myofibroblasten handelt, andererseits aber auch um infiltrierende Immunzellen, die nach UUO in die Niere einwandern.

Es konnte gezeigt werden, dass es infolge der neonatalen Ureterligatur, die am 2. Lebenstag durchgeführt wurde, zu einer dramatischen Reduktion tubulärer Proliferation in der Niere am 14. und 21. Lebenstag kommt. Während in den scheinoperierten Kontrollen der neonatalen Niere eine hohe Proliferationsrate in den Tubuluszellen nachweisbar war, war diese nach UUO drastisch reduziert. Die Abnahme der tubulären Proliferation betrug am 7. Lebenstag bereits 17% im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Am 14. Lebenstag war eine signifikante Reduktion der tubulären Proliferation um 84% und am 21. Lebenstag eine signifikante Reduktion um 79% in der neonatalen UUO-Niere nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen überein mit bisher publizierten Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen, die in Mäusen und Ratten mit UUO eine Reduktion tubulärer Proliferation zeigen [80, 95, 123]. Im Gegensatz zum neonatalen Modell konnten Untersuchungen an adulten Mäusen mit UUO eine Zunahme tubulärer Proliferation nachweisen, was für eine unterschiedliche Regenerationsfähigkeit von neonatalen und adulten Tubuluszellen spricht und auf die hohe Vulnerabilität der sich noch entwickelnden neonatalen Niere hinweist. Folge dieser reduzierten Proliferation in der neonatalen Niere ist die Abnahme an Nierenmasse, die bei Patienten mit CAKUT-Erkrankungen zu einem lebenslang erhöhten Dialyserisiko führt [124-127].

Auch die Proliferation in den Glomeruli war nach neonataler Ureterligatur signifikant reduziert. Im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe war die Proliferation glomerulärer Zellen um 36% reduziert und verdeutlicht erneut die Schädigung einer obstruktiven Uropathie, die nicht nur das Tubulointerstitium sondern auch die Glomeruli betrifft. Eine genauere Differenzierung

der glomerulär proliferierenden Zellen erfolgte in dieser Arbeit jedoch nicht. Ob es sich daher bei diesen proliferierenden Zellen um Podozyten, Mesangialzellen, Endothelzellen oder Makrophagen in den Glomeruli handelt, kann aktuell nicht beantwortet werden. Die tendenzielle Zunahme der glomerulären Proliferation im zeitlichen Verlauf könnte aber auf die lokale Proliferation von Makrophagen hinweisen, deren Zunahme in den Glomeruli erst an Tag 21 statistisch relevant war (vgl. 4.2). Publizierte Daten zur glomerulären Proliferation liegen hauptsächlich aus Untersuchungen von primär glomerulären Erkrankungen wie den Immunkomplex-Glomerulonephritiden oder den Komplement-vermittelten Nierenerkrankungen vor [128, 129]. Bei diesen Krankheitsbildern lässt sich eine glomeruläre Proliferation von Makrophagen experimentell nachweisen [129]. Neben inflammatorischen Zellen könnten aber auch wie bei der IgA-Nephritis oder der diabetischen Nephropathie mesangiale Zellen in den Glomeruli proliferieren, welche an der Entstehung einer Glomerulosklerose beteiligt sind [117, 128].

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Proliferation interstitieller Zellen in der neonatalen Niere gemessen, bei denen es sich einerseits um proliferierende renale Fibroblasten und Myofibroblasten handelt und andererseits auch um infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen. Die interstitielle Auswertung zeigte folgendes Bild in der neonatalen Niere: im Gegensatz zur reduzierten Proliferation tubulärer Zellen nahm die Proliferation interstitieller Zellen nach UUO nicht ab, sondern tendenziell sogar zu. Die Zunahme interstitieller Proliferation war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Dieses Ergebnis ist vor allem vor dem Hintergrund der Frage einer lokalen Proliferation von Immunzellen in der Niere versus eine Rekrutierung von Immunzellen aus der Blutbahn interessant und deutet hier hauptsächlich auf die Rekrutierung hin, die von unserer und anderen Arbeitsgruppen auch im UUO-Modell publiziert wurde [5, 6, 78-82]. Neben der Rekrutierung von Makrophagen spielt aber auch die lokale Proliferation von Makrophagen in der Niere eine Rolle. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass es nach experimenteller Blockade der Leukozytenrekrutierung, bei welcher auch die Makrophagenrekrutierung signifikant reduziert wird, im Verlauf zu einer Zunahme der Makrophagenanzahl in der neonatalen UUO-Niere kommt, die durch lokale Proliferation zu erklären ist [95, 96]. Die lokale Proliferation von Makrophagen wurde auch von Le Meur et al. gezeigt, die im UUO-Modell bei adulten Mäusen nachweisen konnten, dass die Blockade des M-CSF- (*macrophage colony stimulating factor*) zugehörigen Rezeptors c-fms (entspricht CSF-1R) zur Proliferationsabnahme und reduzierten Makrophagenanzahl führt [130]. Auch im Modell der Ischämie-Reperfusions-induzierten renalen Fibrose bei Mäusen konnten Deng et al. 2020 zeigen, dass die Hemmung des Rezeptors für *colony-stimulating factor-1* (CSF-1R), dessen spezifische Liganden CSF-1 und IL-34 die Differenzierung und Proliferation von Makrophagen auslösen, zur Reduktion von M2-Makrophagen führt [131]. Diese publizierten Daten

unterstreichen daher, dass es neben der Makrophagenrekrutierung aus der Blutbahn auch zur lokalen Proliferation von Makrophagen in verschiedenen experimentellen Modellen einer Nierenerkrankung (Glomerulonephritis, Akutes Nierenversagen, UUO) kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Analyse proliferierender interstitieller Zellen nicht zwischen den verschiedenen Zelltypen des renalen Interstitiums differenziert werden, sodass neben inflammatorischen Zellen vermutlich auch proliferierende interstitielle Fibroblasten, Myofibroblasten und Perizyten erfasst wurden. Diese Unterscheidung wäre sicher wichtig und sollte durch entsprechende immunhistochemische Analysen noch ergänzt werden. Eine signifikante Zunahme der interstitiellen Proliferation konnte jedenfalls in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigen tierexperimentelle Untersuchungen an adulten Ratten einen zweigipfligen Anstieg der renalen interstitiellen Proliferation nach UUO. So kommt es in diesen adulten UUO-Nieren zuerst zwischen Tag 1 und Tag 25 zu einer Zunahme der interstitiellen Proliferation und dann im späteren Verlauf zwischen Tag 60 und Tag 90 erneut zu einer Zunahme proliferierender interstitieller Zellen, die initial als Zunahme proliferierender Immunzellen und zum späteren Zeitpunkt als Proliferation renaler Fibroblasten erklärt wird [125, 132]. Möglicherweise ist das Untersuchungszeitfenster bei den neonatalen Mäusen mit 3 Wochen versus 3 Monate bei adulten Ratten nicht ausreichend, um diesen 2-gipfligen Verlauf der interstitiellen Proliferation nach UUO abzubilden.

4.4 Apoptose

Zur Untersuchung der Pathophysiologie und des Ausmaßes der renalen Schädigung nach unilateraler Ureterligatur im neonatalen Mausmodell wurde die Apoptose mittels TUNEL-Assay in der Niere analysiert. Die unilaterale Ureterligatur, die am 2. Lebenstag durchgeführt wurde, induzierte in der neonatalen Mausniere sowohl eine Zunahme tubulärer, als auch interstitieller und glomerulärer Apoptose. Am 3. Lebenstag war die Apoptose in den Tubuluszellen der UUO-Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle noch unverändert. Am 7. Lebenstag zeigte sich bereits eine 2,4-fache Zunahme der tubulären Apoptose, am 14. Lebenstag eine 5-fache Zunahme und am 21. Lebenstag eine 8,1-fache Zunahme tubulärer Apoptose in der neonatalen UUO-Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Diese Zunahme tubulärer Apoptose war am 7., 14. und 21. Lebenstag statistisch signifikant. Auch die Caspase-8 Expression, die einen Apoptosemarker darstellt und mittels Western Blot in der neonatalen UUO-Niere bestimmt wurde, bestätigte die histochemischen Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit konnte eine kontinuierliche und signifikante Abnahme der Caspase-8-Expression als

Zeichen vermehrter Apoptoseaktivität in der ureterligierten Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen überein mit einer Vielzahl von Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine signifikante Zunahme der tubulären Apoptose nach unilateraler Ureterligatur belegen [72, 80, 82, 86, 95, 98, 123]. Wie lässt sich diese Zunahme an tubulärer Apoptose im UUO-Modell erklären?

Pathophysiologisch kommt es nach UUO zu einer Hydronephrose der ligierten Niere mit Dilatation der Sammelrohre und distalen Tubuli und zur Schädigung des tubulointerstitiellen Kompartments. Cachat et al. konnten eine direkte Korrelation zwischen der tubulären Dilatation und dem Ausmaß der tubulären Apoptose nach UUO nachweisen [123]. Besonders betroffen von der Apoptose sind nach neonataler UUO die Sammelrohre und distalen Tubuli, was durch eine primär hydrostatische Schädigung der prästenotischen Tubuluszellen erklärbar ist [123]. Passend dazu konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass signifikant mehr Apoptose in den distalen als in den proximalen Tubuli der neonatalen UUO-Niere nachweisbar ist [86, 98]. Neben der hydrostatischen Apoptose-Induktion spielen bei der Pathophysiologie der UUO aber noch weitere Mechanismen eine Rolle. So kommt es neben der Hydronephrose zur Vasokonstriktion mit verminderter Perfusion der Niere und daraus resultierender Ischämie und Hypoxie [76, 78]. Infolge der Minderperfusion wird das Renin-Angiotensin-Systems in der neonatalen Niere aktiviert, das zur Vasokonstriktion führt, TGF- β_1 freisetzt und Apoptose induziert [5, 76, 133]. Weitere Auslöser tubulärer Apoptose in der UUO-Niere sind der oxidative Stress und die bereits genannten löslichen pro-apoptotischen Faktoren wie z.B. TGF- β_1 , TNF- α und Angiotensin II, die bei der Apoptose-Induktion eine wichtige Rolle spielen [96, 134, 135]. Im Umkehrschluss konnten Miyamjia et al. zeigen, dass der Anti-TGF- β_1 -Antikörper die Apoptose nach unilateraler Ureterligatur in adulten Rattennieren reduziert [134]. Diese TGF- β_1 -abhängige Apoptose konnten Galarreta et al. durch Blockade des TGF- β_1 -Rezeptors in adulten Mäusen bestätigen und eine reduzierte Apoptose in der UUO-Niere durch die TGF- β_1 -Rezeptor-Hemmung zeigen [135]. In neonatalen Mäusen war hingegen ein negativer Effekt nachweisbar, der vermutlich mit der entwicklungsgeschichtlich unterschiedlichen TGF- β Expression und Wirkung in adulten und neonatalen Mäusen zu tun hat [135]. Diese konträren Ergebnisse spiegeln sich auch in den negativen Effekten einer RAAS-Blockade in der Fetal- und Neonatalzeit wider, die bei Schwangeren und Neonaten kontraindiziert ist, im Vergleich zu den positiven Effekten einer ACE-Hemmer-Therapie bei abgeschlossener Nierenentwicklung. Sie verdeutlichen erneut die differente Rolle des RAAS-Systems und von TGF- β in der Nierenentwicklung und -reifung und die Unterschiede zwischen dem neonatalen und adulten UUO-Modell. Eine direkte Übertragbarkeit der im adulten UUO-Modell gewonnenen Erkenntnisse ist daher auf die neonatale UUO-Situation mit einer sich noch entwickelnden Niere nicht möglich. Die Vergleichbarkeit adulter und neonataler UUO-Tiermodelle ist daher nicht gegeben [135-137]. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass

verglichen mit adulten Nieren die tubuläre Apoptose in neonatalen Nieren mit UUO viel ausgeprägter ist, was sowohl auf die postnatal in Mäusen noch stattfindende Nierenentwicklung zurückzuführen ist, als auch auf die verminderte Regenerationsfähigkeit in dieser vulnerablen Phase der Nierenentwicklung [138, 139]. Die Theorie der erhöhten Vulnerabilität neonataler Nieren mit eingeschränktem Regenerationspotential bestätigen auch Daten von Chevalier et al., die nach einer zeitlich begrenzten aber unterschiedlich lange durchgeführten Ureterligatur in neonatalen Tieren einen konstanten irreversiblen tubulointerstitiellen Nierenschaden zeigen [138].

Eine weitere zentrale Rolle bei der Entwicklung renaler Apoptose im neonatalen UUO-Modell spielen Makrophagen [76, 82, 140-142]. Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von Mediatoren wie reaktive Sauerstoffradikale (ROS), Stickstoffmonoxid, pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6, Chemokine wie MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein-1 =CCL2*) und profibrotische Zytokine wie PDGF und TGF- β_1 und können dadurch tubuläre Apoptose induzieren [4, 5, 7, 83, 114, 141, 143, 144]. Diese pro-apoptotische Fähigkeit von Makrophagen konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden [141, 145]. Wie bereits beschrieben, sezernieren insbesondere M1-Makrophagen Zytokine und Mediatoren, die pro-apoptotisch wirken [108, 111, 113]. Im Hinblick auf die verschiedenen Makrophagensubtypen in der Niere beschrieben Anders et al. eine bei subakuter oder chronischer Nierenschädigung geförderte Polarisation zu M2-Makrophagen, die durch das vorherrschende Apoptose-Milieu zustande kommt [116]. Diese mögliche Polarisation zu M2-Makrophagen könnte auch im neonatalen UUO-Modell stattgefunden haben, da in der vorliegenden Arbeit ab dem 7. Lebenstag der Maus und damit ab dem 5. postoperativen Tag nach UUO ein signifikanter Anstieg von Galectin 3-positiven M2-Makrophagen in der Niere bei parallel zunehmender Apoptose nachweisbar ist (vgl. 4.2).

Wenn auch die tubuläre Apoptose am stärksten in der neonatalen UUO-Niere war, zeigte sich auch eine signifikante Zunahme interstitieller Apoptose in der neonatalen Niere mit UUO. Am 3. Lebenstag war die Anzahl der interstitiellen apoptotischen Zellen in den ureterligierten Nieren im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe noch unverändert. Am 7. Lebenstag und damit 5 Tage nach der UUO, konnte eine 1,7-fache Zunahme interstitieller apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Am 14. Lebenstag lag bereits eine 2,6-fache Zunahme und am 21. Lebenstag eine 3,1-fache Zunahme interstitieller apoptotischer Zellen vor. Diese Zunahme interstitieller Apoptose war vom 7. bis 21. Lebenstag statistisch signifikant. Yoo et al. untersuchten ebenfalls die Auswirkung einer unilateralen Ureterligatur bei neonatalen Mäusen und konnten bis zum 21. Lebenstag eine progrediente, vom Obstruktionsgrad abhängige Zunahme interstitieller Apoptose zeigen [146]. Unsere Arbeitsgruppe wies eine UUO-induzierte interstitielle Apoptose an neonatalen Mäusen bis zum 14. Lebenstag nach, die durch eine experimentelle JAK2/STAT3-Inhibition erfolgreich reduziert werden konnte [95]. Dieser

anti-apoptotische Effekt der experimentellen JAK2/STAT3-Blockade ist durch die STAT3-regulierte Expression der pro-apoptotischen Zytokine TNF- α und TGF- β_1 erklärt, die durch die Inhibition reduziert wird und dadurch weniger Apoptose in der neonatalen Niere auslöst [95]. Bei den nachgewiesenen TUNEL-positiven Zellen im Interstitium der neonatalen UUO-Niere kann es sich sowohl um Immunzellen als auch um Fibroblasten und Myofibroblasten handeln, die als apoptotische Zellen in Frage kommen. Eine Differenzierung z.B. anhand einer Doppelfärbung wäre daher zukünftig anzuschließen. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass auch der auf Immunzellen, Myofibroblasten und renalen Tubuluszellen exprimierte *Toll like receptor 2* (TLR2) eine Rolle bei der Apoptose nach UUO spielt [98]. In den Nieren neonataler TLR2-Knockout Mäuse zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp-Nieren eine signifikante Reduktion sowohl tubulärer als auch interstitieller Apoptose nach UUO, was dafür spricht, dass es TLR2-vermittelt sowohl zur Apoptose von Tubuluszellen kommt als auch zur interstitiellen Apoptose von Leukozyten, Fibroblasten und Myofibroblasten [98]. Zusammenfassend sind viele Pathomechanismen an der Induktion tubulärer und interstitieller Apoptose bei neonataler UUO beteiligt.

Die Auswertung der glomerulären Apoptose zeigte in der vorliegenden Arbeit zunächst keine Änderung und erst am 21. Lebenstag der Maus und damit 19 Tage nach der Ureterligatur eine signifikante Zunahme glomerulärer Apoptose. Ursächlich für diese glomeruläre Apoptose sind viele der bereits genannten Faktoren wie Ischämie, Hypoxie und die Freisetzung pro-apoptotischer Zytokine in der Niere. Da es infolge der primären Tubulusschädigung bei UUO zur tubuloglomerulären Diskonnektion und zur Entwicklung atubulärer Glomeruli kommt, werden auch die Glomeruli im Verlauf geschädigt [7, 75-77]. Insbesondere in Podozyten wird durch pro-apoptotische Zytokine wie z.B. TGF- β_1 Apoptose ausgelöst, was negative Auswirkungen auf die Nierenfunktion hat [128, 147-149]. Der zeitlich erst späte Nachweis einer glomerulären Apoptose in der vorliegenden Arbeit korreliert mit dem späten Nachweis von Galectin 3-positiven M2-Makrophagen am 21. Lebenstag, was die Theorie der milieuspezifischen Differenzierung von M1- zu M2-Makrophagen unterstützt [116].

Neben der Apoptose und Nekrose rückt zunehmend auch die Nekroptose als weitere Form des programmierten Zelltodes in den Fokus obstruktiver Uropathien. Die Nekroptose ist ein Prozess, der über definierte molekulare Signalwege wie die Aktivierung von RIPK3 (*receptor interacting protein kinase 3*) und der Pseudokinase MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like*) gesteuert wird. Die Nekroptose gehört damit zu den programmierten Nekrose-Formen [86, 150]. Das sogenannte Nekrosom wird über u.a. *Toll-like* Rezeptoren oder sogenannte Todesrezeptoren aktiviert [150]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es nach unilateraler Ureterligatur im neonatalen Mausmodell zur Hochregulation von RIPK3 und MLKL kommt und damit Nekroptose und Nekroinflammation im neonatalen Modell der obstruktiven Uropathie nachweisbar ist [86].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die unilaterale Ureterligatur bei neonatalen Mäusen tubuläre, interstitielle und glomeruläre Apoptose induziert. Möglicherweise werden zukünftig Apoptose-Marker im Urin als Biomarker obstruktiver Uropathien ihren Einsatz finden. Erste Studien mit kleinen Fallzahlen liegen bei Patienten mit Ureteropelviner Stenose vor und haben die Marker TGF- β , Caspase 3 und KIM-1 (*kidney injury molecule-1*) untersucht [86, 151, 152].

4.5 Interstitielle Fibrose

Bei der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz spielt besonders die Zunahme interstitieller Fibrose eine wichtige Rolle [4, 83]. Diese Fibrose ist durch die gesteigerte Ablagerung extrazellulärer Matrix interstitiell und peritubulär gekennzeichnet und führt durch die Verbreiterung des Raumes zwischen Kapillaren und Tubuluszellen zu einer weiteren Hypoxie-bedingten Tubulusschädigung mit konsekutivem renalem Funktionsverlust [83, 84, 153]. Neben der Ablagerung von fibrillärem Kollagen (insbesondere Kollagen Typ I und Typ II, Typ V und Typ XI) kommen auch Bestandteile der kapillären Basalmembran wie Kollagen IV und V, Proteoglykane, Laminin und Fibronectin in der Extrazellulärmatrix vor [78, 83, 84]. Insbesondere aktivierte Myofibroblasten sind bei Niereninsuffizienz und im UUO-Modell für die Ablagerung extrazellulärer Matrix verantwortlich [5, 6, 83, 84, 138].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung interstitieller Fibrose sowohl durch die Expression von α -SMA als Myofibroblastenmarker, als auch durch den Nachweis von Kollagenfasern in der Niere analysiert. In der α -SMA-Färbung ureterligierter Nieren ließ sich ein kontinuierlicher und signifikanter Anstieg aktiver Myofibroblasten in der UUO-Niere bis auf das 3,2-fache am 21. Lebenstag im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle nachweisen. Parallel dazu konnte mittels Western Blot ein kontinuierlicher und statistisch signifikanter Anstieg der α -SMA-Expression in der UUO-Niere bis auf das 3,4-fache am 21. Lebenstag gemessen werden. Als weiterer Fibrose-Marker wurde die Ablagerung von Kollagen mittels Masson Trichrome-Färbung analysiert. Die unilaterale Ureterligatur führte in der vorliegenden Arbeit zu einer progredienten Ablagerung von Kollagen in den neonatalen Nieren. Am 3. Lebenstag konnte eine 1,5-fache Zunahme Kollagen-positiver Felder in der UUO-Niere gemessen werden. Am 7. Lebenstag zeigte sich eine 2,7-fache Kollagen-Zunahme, am 14. Lebenstag eine 5,6-fache Zunahme und am 21. Lebenstag eine 11,4-fache Zunahme der Kollagenablagerungen nach UUO. Diese erhobenen Daten stimmen überein mit vielen anderen Studien an adulten und neonatalen UUO-Mäusen, die ebenfalls eine progrediente Fibrose und Zunahme aktiver Myofibroblasten zeigen [80, 82, 95, 96, 98, 123]. Das Ausmaß

der Fibrose nach UUO ist dabei sowohl vom Obstruktionsgrad als auch von der Obstruktionsdauer abhängig [146]. Aktivierte Myofibroblasten initiieren und produzieren extrazelluläre Matrix nach unilateraler Ureterligatur [78, 83]. Der Ursprung dieser aktivierte Myofibroblasten ist vielfältig [83]. Zum einen können sich Myofibroblasten aus residenten Nierenzellen, zum anderen aber auch aus eingewanderten Zellen entwickeln [68, 85]. Ungefähr die Hälfte der Myofibroblasten entsteht durch lokale Proliferation aus renalen Fibroblasten. Die andere Hälfte entsteht durch Differenzierung aus anderen Zelltypen [85]. Diese stellen zum einen Tubulusepithelzellen dar, welche in ca. 5% durch eine Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) zu Myofibroblasten differenzieren [72, 85, 96]. In ca. 10% entstehen aktivierte Myofibroblasten aus endothelialen Zellen mittels Endothelial-Mesenchymaler Transition (EndMT) [85]. Circa 35% der aktivierten Myofibroblasten entstehen aus eingewanderten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark [85]. Zudem scheinen auch Perizyten durch interstitielle Einwanderung einen Einfluss auf die Differenzierung zu Myofibroblasten zu haben [83, 93]. Makrophagen, die aus dem Knochenmark in die Niere einwandern, können auch direkt über eine sogenannte Makrophagen-zu-Myofibroblasten-Transition (MMT) in Myofibroblasten übergehen und zur Entwicklung interstitieller Fibrose beitragen [107, 154, 155]. Dabei konnte durch den Nachweis einer Koexpression von Myofibroblasten- und Makrophagenmarkern gezeigt werden, dass insbesondere M2-Makrophagen über den TGF- β_1 /Smad3-Signalweg an der Myofibroblastenentstehung beteiligt sind [107, 155, 156]. Diese publizierten Daten unterstützen die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse, dass insbesondere Galectin 3-positive M2-Makrophagen an der Entwicklung interstitieller Fibrose nach neonataler UUO beteiligt sind. Makrophagen haben über die Sekretion pro-fibrotischer Faktoren wie TGF- β_1 , TNF- α und PDGF eine aktivierende Wirkung auf die Myofibroblasten-Differenzierung und stimulieren die Bildung extrazellulärer Matrix [96, 107, 116, 157]. Zahlreiche Publikationen konnten den kausalen Zusammenhang zwischen Makrophageninfiltration und interstitieller Fibrose belegen. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die experimentelle JAK/STAT3-Blockade sowohl zur Reduktion der Makrophageninfiltration als auch der interstitiellen Fibrose führt [95]. Yan et al. konnten zeigen, dass eine Blockade des JAK3/STAT6-Signalweg im UUO-Modell nicht nur M2-Makrophagen, sondern auch Myofibroblasten und renale Fibrose reduziert [158].

Wie bereits erwähnt haben auch Perizyten und das PDGF/PDGFR-System einen Einfluss auf die renale Fibrose und stimulieren die Differenzierung zu Myofibroblasten [83, 93]. Um diesen Effekt der Perizyten auch im neonatalen UUO-Modell zu untersuchen, wurde die Expression des PDGF-Rezeptor- β mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der PDGFR- β -Expression am 14. und 21. Lebenstag in der neonatalen UUO-Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle und somit eine Hochregulation von PDGF-Rezeptor-

β nach UUO. Wie lassen sich diese Ergebnisse im Kontext einordnen? Das PDGF/PDGFR-System besteht aus verschiedenen Isoformen des *Platelet-derived growth factor* (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC und -DD) und zwei verschiedenen Rezeptorketten (PDGFR- α und PDGFR- β , die zu den Tyrosin-Kinasen PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ und PDGFR- $\beta\beta$ dimerisieren), welche sowohl eine Rolle in der Nierenentwicklung als auch bei der Zellmigration, Proliferation, bei der Entstehung und Ablagerung extrazellulärer Matrix und der Angio- und Hämatopoiese spielen [89, 90]. PDGFs sind wichtige Mitogene und Signalstoffe für mesenchymale Zellen und werden u.a. von Tubuluszellen, Podozyten und dendritischen Zellen produziert [159, 160]. Die PDGF-Rezeptoren werden wiederum von Perizyten, interstitiellen Fibroblasten und glomerulären Mesangialzellen exprimiert [83, 93, 160]. Die verschiedenen PDGF-Isoformen sind durch eine unterschiedliche Bindungssaffinität zu den verschiedenen Rezeptorketten gekennzeichnet [89, 90, 159, 160]. An den PDGF-Rezeptor- β binden die Isoformen PDGF-BB und PDGF-DD [89]. Durch diese Liganden-Rezeptorbindung werden verschiedene Signalkaskaden wie RAS-MAPK (*rat sarcoma-mitogen-activated protein kinase*), PI3K (*phosphatidyl-inositol-3-kinase*), JAK/STAT und PLC- γ (*phospholipase C- γ*) aktiviert, welche profibrotisch wirken können [89-91, 159]. PDGF-BB und PDGF-DD, die als Liganden des PDGFR- β fungieren, induzieren dabei sowohl die Aktivierung und Proliferation mesangialer Zellen mit der Entwicklung einer Glomerulosklerose als auch eine tubulointerstitielle Fibrose [90]. Humphreys et al. und Lin et al. konnten zeigen, dass Perizyten nach unilateraler Ureterligatur sowohl α -SMA als auch PDGFR- β exprimieren, was für eine Differenzierung dieser Perizyten zu Myofibroblasten spricht [92, 93]. In weiteren Studien konnte durch eine spezifische Antikörper-vermittelte Inhibition von PDGFR- α oder PDGFR- β und durch den PDGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitor Imatinib bei adulten Mäusen nach UUO eine Reduktion der Proliferation, der Differenzierung von Perizyten sowie eine Reduktion interstitieller Fibrose beobachtet werden [161]. Auch im PDGF-D-Knock-out-Modell zeigte sich bei adulten Mäusen mit UUO eine signifikante Reduktion interstitieller Fibrose, was die Relevanz von PDGFR- β bei der Entwicklung renaler Fibrose erneut unterstreicht [162]. Welche genaue Rolle Perizyten bei der Differenzierung zu Myofibroblasten und der renalen Fibrose bei obstruktiven Uropathien wirklich spielen, wird jedoch noch kontrovers diskutiert. Le Bleu et al. konnten 2013 mittels *fate-mapping* zeigen, dass Perizyten nur eine untergeordnete Rolle bei der Differenzierung von Myofibroblasten und der Entwicklung interstitieller Fibrose nach UUO spielen [85]. Kuppe et al. zeigten demgegenüber 2021 mittels *single-cell-RNA-sequencing* in murinen und humanen Nieren, dass PDGFR- α und PDGFR- β -positive Fibroblasten und Myofibroblasten, welche sich aus Perizyten und Fibroblasten entwickeln, die entscheidenden Zellpopulationen bei der Produktion extrazellulärer Matrix und der Entwicklung renaler Fibrose sind [163]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Perizyten und das PDGF/PDGFR-System an der Entwicklung interstitieller Fibrose nach UUO beteiligt sind.

Zusammengefasst induziert die unilaterale Ureterligatur bei neonatalen Mäusen die Aktivierung von Myofibroblasten und die Ablagerung von Kollagen, wobei insbesondere M2-Makrophagen eine relevante Beteiligung zuzuschreiben ist.

4.6 Tubuläre Atrophie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung tubulärer Atrophie nach unilateraler Ureterligatur in der neonatalen Mausniere untersucht. Dazu wurde eine PAS-Färbung der tubulären Basalmembran durchgeführt und die tubuläre Atrophie nach festgelegten Kriterien wie Verdickung (*thickening*), Zerfaserung (*duplication*), Wellenbildung (*wrinkling*) und Verdünnung (*thinning*) beurteilt. Die Veränderung der tubulären Basalmembran wurde nach proximalen und distalen Tubuli getrennt analysiert. Es zeigte sich, dass die Ureterligatur sowohl zu einer progradienten Atrophie proximaler als auch distaler Tubuli in der neonatalen Mausniere führte. Die proximalen Tubuli waren aber im Vergleich zu den distalen Tubuli wesentlich stärker von der Atrophie betroffen. Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,5-facher Anstieg in den proximalen Tubuli im Vergleich zu den distalen Tubuli der ureterligierten Niere, am 7. Lebenstag ein 3,2-facher Anstieg, am 14. Lebenstag ein 2,8-facher Anstieg und am 21. Lebenstag ein 6,2-facher Anstieg der Tubulusatrophie in den proximalen Tubuli im Vergleich zu den distalen Tubuli. In den Nieren der scheinoperierten Kontrolle und in den Nieren der kontralateralen Gegenseite war keine tubuläre Atrophie nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen überein mit bisher publizierten Daten von neonatalen [80, 86, 96] und adulten [85, 97, 164] Mäusen und Ratten nach unilateraler Ureterligatur. Pathophysiologisch sind besonders die proximalen Tubuli anfällig für jede Art von mechanischer, oxidativer, hypoxischer oder metabolischer Schädigung [5, 77, 124]. Aufgrund ihrer hohen Dichte an Mitochondrien reagieren sie sensibel auf Ischämie und Hypoxie [124]. Bei neonatalen Mäusen wird darüber hinaus angenommen, dass der Wechsel von anaerober Glykolyse zu oxidativem Metabolismus die Anfälligkeit der proximalen Tubuluszellen für oxidativen Stress erklärt [165]. Zusammen mit einer geringeren mitotischen Kompensationsfähigkeit führt dies frühzeitig über Nekrose, Apoptose und Autophagie der proximalen Tubuluszellen zur Atrophie des proximalen Tubulus [72, 77, 124, 166].

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass die unilaterale Ureterligatur im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie zu einer tubulären Atrophie führt, welche die proximalen Tubuli stärker betrifft als die distalen Tubuli.

4.7 Scheinoperation

In der vorliegenden Arbeit konnten in der scheinoperierten Kontrollgruppe, bei der das Abdomen der neonatalen Mäuse am 2. Lebenstag unter Isofluran-Narkose nur eröffnet, der Harnleiter aber nicht ligiert wurde, keine relevanten Veränderungen in der neonatalen Niere am 3., 7., 14. und 21. Lebenstag festgestellt werden. Dies entspricht auch den publizierten Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen [80, 86, 96, 139, 141], die in der Kontrollgruppe ebenfalls keine Veränderungen in der Niere detektieren konnten. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob im Hinblick auf die Tierschutz-Versuchstierverordnung des Bundesamts für Justiz und das „3R-Prinzip“ die scheinoperierte Kontrollgruppe durch eine nicht-operierte Kontrollgruppe ersetzt werden könnte [167]. Das von W.M.S. Russel und R.L. Burch 1959 definierte „3R-Prinzip“ besagt, dass Tierversuche möglichst zu vermeiden sind (*replacement*) oder die Anzahl der Tiere (*reduction*) und deren Leiden (*refinement*) auf ein minimal mögliches Maß reduziert werden sollen [168, 169].

Atkinson et al. haben hierzu 2021 in einer Studie im adulten Tiermodell der obstruktiven Uropathie im Hinblick auf diese Fragestellung scheinoperierte und nicht-operierte C57BL/6J Mausnieren verglichen [170]. Dabei wurden am 7., 14. und 21. Tag die renale interstitielle Fibrose mittels Kollagennachweis über eine PicoSirius Rot-Färbung und die mRNA-Expression verschiedener für die Fibrose relevanter Schlüsselproteine und -regulatoren wie Fibronectin, Kollagen 1, TGF β 1, PDGFR- β , TIMP1 (*Tissue inhibitor of metalloprotease 1*) und Alpha-Actin-2 (ACTA2, als Nachweis von α -SMA) untersucht [170]. Hierbei zeigten sich jeweils keine Unterschiede zwischen der scheinoperierten Kontrollgruppe und den nicht-operierten Tieren [170].

Diese Untersuchung erfolgte jedoch an adulten und nicht an neonatalen Tieren, bei denen im Tiermodell der obstruktiven Uropathie aufgrund der noch stattfindenden Nierenentwicklung Veränderungen auch in der scheinoperierten Niere relevant sein könnten. Dennoch sollte die Notwendigkeit einer scheinoperierten Kontrollgruppe zukünftig kritisch hinterfragt werden.

5 Ausblick

Konnatale obstruktive Uropathien sind eine häufige Ursache chronisch terminaler Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter, weshalb diesem Krankheitsbild eine enorme klinische Relevanz zukommt [5-7]. Das genaue Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bildet das Fundament zur Entwicklung neuer Diagnostik sowie zukünftiger Therapien, um Nierenmasse und -funktion bei Patienten mit kongenitalen obstruktiven Uropathien besser zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung des Tiermodells der unilateralen Ureterligatur bei neonatalen Mäusen gezeigt werden, dass obstruktive Uropathien zu einer tubulointerstitiellen Schädigung der Niere führen mit vermehrter Apoptose, tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose, an der T-Lymphozyten und M2-Makrophagen beteiligt sind.

Diese Erkenntnisse können möglicherweise nicht nur der Entwicklung neuer Therapiestrategien dienen mit dem Ziel, die interstitielle Fibrose und Inflammation in der neonatalen Niere zu reduzieren, sondern auch zur Etablierung neuer Biomarker beitragen, um die Versorgung von Patienten mit obstruktiver Uropathie zu verbessern.

Gegenstand der aktuellen Forschung sind die Identifizierung und Validierung von Urin-Biomarkern bei Patienten mit Ureteropelviner Stenose. Verschiedene Marker wurden bereits in kleinen Fallzahlen untersucht wie zum Beispiel NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*), TGF- β ₁, MCP-1 und KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) [32, 36-38]. Auch mittels Urinproteom- und Metabolom-Analyse konnten in monozentrischen Studien Unterschiede zwischen konservativ behandelten und operativ versorgten Patienten mit ureteropelviner Stenose festgestellt werden [42, 171], die zukünftig in größeren multizentrischen Studien zu bestätigen sind. Viele dieser Marker wurden initial im Tiermodell der obstruktiven Uropathie beschrieben und signalisieren Inflammation und fibrotischen Gewebeumbau in der neonatalen Niere mit UUO. Möglicherweise kann die vorgelegte Arbeit einen Beitrag zur Identifizierung neuer Biomarker leisten.

Literaturverzeichnis

1. Beetz, R., *[Congenital dilatation of the upper urinary tract : Current diagnostic and treatment concepts]*. Urologe A, 2018. **57**(8): p. 969-986.
2. Beetz, R., et al., *[Diagnosis of congenital dilatation of the urinary tract. Consensus Group of the Pediatric Nephrology Working Society in cooperation with the Pediatric Urology Working Group of the German Society of Urology and with the Pediatric Urology Working Society in the Germany Society of Pediatric Surgery]*. Urologe A, 2001. **40**(6): p. 495-507; quiz 508-9.
3. Chevalier, R.L., *Congenital urinary tract obstruction: the long view*. Adv Chronic Kidney Dis, 2015. **22**(4): p. 312-9.
4. Lange-Sperandio, B., *Pediatric Obstructive Uropathy*, in *Pediatric Nephrology*, E.D. Avner, et al., Editors. 2016, Springer Verlag Berlin-Heidelberg: Berlin. p. 1749 - 1777.
5. Chevalier, R.L., et al., *Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(4): p. 687-97.
6. Klein, J., et al., *Congenital ureteropelvic junction obstruction: human disease and animal models*. Int J Exp Pathol, 2011. **92**(3): p. 168-92.
7. Truong, L.D., L. Gaber, and G. Eknayan, *Obstructive uropathy*. Contrib Nephrol, 2011. **169**: p. 311-326.
8. Koff, S.A. and K.D. Campbell, *The nonoperative management of unilateral neonatal hydronephrosis: natural history of poorly functioning kidneys*. J Urol, 1994. **152**(2 Pt 2): p. 593-5.
9. Peters, C.A., *Urinary tract obstruction in children*. J Urol, 1995. **154**(5): p. 1874-83; discussion 1883-4.
10. Peters, C.A. and K.K. Meldrum, *Pathophysiology of Urinary Tract Obstruction*, in *Campbell-Walsh-Wein Urology*, A.W. Partin, et al., Editors. 2020, Elsevier. p. 776-797.
11. Lassmann, J., B. Lange-Sperandio, and K. Zahn, *Ureteropelvic Stenose*, in *Die Kinder- und Jugendurologie*, R. Stein, et al., Editors. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 158-169.
12. Chang, C.P., et al., *Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 1051-8.
13. Chevalier, R.L., *Perinatal obstructive nephropathy*. Semin Perinatol, 2004. **28**(2): p. 124-31.
14. Hosie, S., A. Ebert, and L.T. Weber, *Primärer und sekundärer Megaurter*, in *Die Kinder- und Jugendurologie*, D.R. Stein, et al., Editors. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 190-198.
15. Rubenwolf, P., et al., *Primary non-refluxive megaureter in children: single-center experience and follow-up of 212 patients*. Int Urol Nephrol, 2016. **48**(11): p. 1743-1749.

16. Rodriguez, M.M., *Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract (CAKUT)*. Fetal Pediatr Pathol, 2014. **33**(5-6): p. 293-320.
17. Klaus, R. and B. Lange-Sperandio, *Chronic Kidney Disease in Boys with Posterior Urethral Valves-Pathogenesis, Prognosis and Management*. Biomedicines, 2022. **10**(8).
18. Rösch, W., U. John-Kroegel, and M. Stehr, *Harnröhrenklappen und Strikturen*, in *Die Kinder- und Jugendurologie*, D.R. Stein, et al., Editors. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 262-274.
19. Wiesel, A., et al., *Prenatal detection of congenital renal malformations by fetal ultrasonographic examination: an analysis of 709,030 births in 12 European countries*. Eur J Med Genet, 2005. **48**(2): p. 131-44.
20. Rickard, M., et al., *Prenatal hydronephrosis: Bridging pre- and postnatal management*. Prenat Diagn, 2022. **42**(9): p. 1081-1093.
21. Yalçınkaya, F. and Z.B. Özçakar, *Management of antenatal hydronephrosis*. Pediatr Nephrol, 2020. **35**(12): p. 2231-2239.
22. Asl, A.S. and S. Maleknejad, *Clinical outcome and follow-up of prenatal hydronephrosis*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012. **23**(3): p. 526-31.
23. Garne, E., et al., *Congenital hydronephrosis: prenatal diagnosis and epidemiology in Europe*. J Pediatr Urol, 2009. **5**(1): p. 47-52.
24. Nguyen, H.T., et al., *The Society for Fetal Urology consensus statement on the evaluation and management of antenatal hydronephrosis*. J Pediatr Urol, 2010. **6**(3): p. 212-31.
25. Nguyen, H.T., et al., *Multidisciplinary consensus on the classification of prenatal and postnatal urinary tract dilation (UTD classification system)*. J Pediatr Urol, 2014. **10**(6): p. 982-98.
26. Wollenberg, A., et al., *Outcome of fetal renal pelvic dilatation diagnosed during the third trimester*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2005. **25**(5): p. 483-8.
27. Ismaili, K., et al., *Long-term clinical outcome of infants with mild and moderate fetal pyelectasis: validation of neonatal ultrasound as a screening tool to detect significant nephrouropathies*. J Pediatr, 2004. **144**(6): p. 759-65.
28. Thom, R.P. and N.D. Rosenblum, *A translational approach to congenital non-obstructive hydronephrosis*. Pediatr Nephrol, 2013. **28**(9): p. 1757-61.
29. Brown, B.P., et al., *ACR Appropriateness Criteria® Antenatal Hydronephrosis-Infant*. J Am Coll Radiol, 2020. **17**(11s): p. S367-s379.
30. Mallik, M. and A.R. Watson, *Antenatally detected urinary tract abnormalities: more detection but less action*. Pediatr Nephrol, 2008. **23**(6): p. 897-904.
31. Chertin, B., et al., *Conservative treatment of ureteropelvic junction obstruction in children with antenatal diagnosis of hydronephrosis: lessons learned after 16 years of follow-up*. Eur Urol, 2006. **49**(4): p. 734-8.
32. Passoni, N.M. and C.A. Peters, *Managing Ureteropelvic Junction Obstruction in the Young Infant*. Front Pediatr, 2020. **8**: p. 242.

33. Weitz, M., et al., *Surgery versus non-surgical management for unilateral ureteric-pelvic junction obstruction in newborns and infants less than two years of age*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **7**(7): p. Cd010716.
34. Boubaker, A., et al., *Unilateral ureteropelvic junction obstruction in children: long-term followup after unilateral pyeloplasty*. J Urol, 2003. **170**(2 Pt 1): p. 575-9; discussion 579.
35. Weitz, M., M. Schmidt, and G. Laube, *Primary non-surgical management of unilateral ureteropelvic junction obstruction in children: a systematic review*. Pediatr Nephrol, 2017. **32**(12): p. 2203-2213.
36. Kostic, D., et al., *The role of renal biomarkers to predict the need of surgery in congenital urinary tract obstruction in infants*. J Pediatr Urol, 2019. **15**(3): p. 242.e1-242.e9.
37. Chevalier, R.L., *Prognostic factors and biomarkers of congenital obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2016. **31**(9): p. 1411-20.
38. Trnka, P., et al., *Congenital urinary tract obstruction: defining markers of developmental kidney injury*. Pediatr Res, 2012. **72**(5): p. 446-54.
39. Paraboschi, I., et al., *Urinary biomarkers in pelvic-ureteric junction obstruction: a systematic review*. Transl Androl Urol, 2020. **9**(2): p. 722-742.
40. Froehlich, J.W., et al., *Urinary Proteomics Yield Pathological Insights for Ureteropelvic Junction Obstruction*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(8): p. 2607-15.
41. Mavrogeorgis, E., et al., *Reproducibility Evaluation of Urinary Peptide Detection Using CE-MS*. Molecules, 2021. **26**(23).
42. Bandin, F., et al., *Urinary proteome analysis at 5-year followup of patients with nonoperated ureteropelvic junction obstruction suggests ongoing kidney remodeling*. J Urol, 2012. **187**(3): p. 1006-11.
43. Chambers, J.M. and R.A. Wingert, *Advances in understanding vertebrate nephrogenesis*. Tissue Barriers, 2020. **8**(4): p. 1832844.
44. Pohl, M., H. Fritsch, and J. Oswald, *Embryologie des Urogenitaltrakts*, in *Die Kinder- und Jugendurologie*, R. Stein, et al., Editors. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 4-16.
45. Rasouly, H.M. and W. Lu, *Lower urinary tract development and disease*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2013. **5**(3): p. 307-42.
46. Bertram, J.F., et al., *Human nephron number: implications for health and disease*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(9): p. 1529-33.
47. dos Santos Junior, A.C., D.M. de Miranda, and A.C. Simões e Silva, *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: an embryogenetic review*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2014. **102**(4): p. 374-81.
48. Airik, R. and A. Kispert, *Down the tube of obstructive nephropathies: the importance of tissue interactions during ureter development*. Kidney Int, 2007. **72**(12): p. 1459-67.
49. Ruano-Gil, D., A. Coca-Payeras, and A. Tejedo-Mateu, *Obstruction and normal recanalization of the ureter in the human embryo. Its relation to congenital ureteric obstruction*. Eur Urol, 1975. **1**(6): p. 287-93.

50. Reis, G.S., et al., *Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. J Pediatr (Rio J), 2014. **90**(1): p. 58-64.
51. Kong, X.T., et al., *Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases*. J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1195-204.
52. Hu, P., et al., *Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux*. J Cell Biol, 2000. **151**(5): p. 961-72.
53. Baker, L.A. and R.A. Gomez, *Embryonic development of the ureter*. Semin Nephrol, 1998. **18**(6): p. 569-84.
54. Lang, R.J. and H. Hashitani, *Pacemaker Mechanisms Driving Pyeloureteric Peristalsis: Modulatory Role of Interstitial Cells*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1124**: p. 77-101.
55. Lang, R.J., et al., *Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 695-705.
56. Di Benedetto, A., et al., *Pacemakers in the upper urinary tract*. Neurourol Urodyn, 2013. **32**(4): p. 349-53.
57. Woolf, A.S. and P.J. Winyard, *Molecular mechanisms of human embryogenesis: developmental pathogenesis of renal tract malformations*. Pediatr Dev Pathol, 2002. **5**(2): p. 108-29.
58. Celsi, G., et al., *Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring*. Pediatr Res, 1998. **44**(3): p. 317-22.
59. Taylor, C.L., et al., *Incidence of renal anomalies in children prenatally exposed to ethanol*. Pediatrics, 1994. **94**(2 Pt 1): p. 209-12.
60. Cain, J.E., et al., *GLI3 repressor controls functional development of the mouse ureter*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 1199-206.
61. Trowe, M.O., et al., *Canonical Wnt signaling regulates smooth muscle precursor development in the mouse ureter*. Development, 2012. **139**(17): p. 3099-108.
62. Miranda, D.M., et al., *Association of angiotensin type 2 receptor gene polymorphisms with ureteropelvic junction obstruction in Brazilian patients*. Nephrology (Carlton), 2014. **19**(11): p. 714-20.
63. Song, R. and I.V. Yosypiv, *Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(3): p. 353-64.
64. Weisschuh, N., et al., *A novel mutation in the FOXC1 gene in a family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters' anomaly*. Clin Genet, 2008. **74**(5): p. 476-80.
65. Yu, S., et al., *Haploinsufficiencies of FOXF1 and FOXC2 genes associated with lethal alveolar capillary dysplasia and congenital heart disease*. Am J Med Genet A, 2010. **152a**(5): p. 1257-62.
66. Habbig, S. and A. Kribs, *Nephrologie der Perinatalperiode*, in *Die Kinder- und Jugendurologie*, R. Stein, et al., Editors. 2023, Springer Berlin, Heidelberg. p. 78-84.

67. van der Ven, A.T., et al., *Whole-Exome Sequencing Identifies Causative Mutations in Families with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(9): p. 2348-2361.
68. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1145-1152.
69. Peters, C.A., *Animal models of fetal renal disease*. Prenat Diagn, 2001. **21**(11): p. 917-23.
70. Thornhill, B.A., et al., *Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: a new model of ureteropelvic junction obstruction*. Kidney Int, 2005. **67**(1): p. 42-52.
71. Chevalier, R.L., *Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development*. Pediatr Nephrol, 1990. **4**(4): p. 442-4.
72. Hiatt, M.J., et al., *Urinary tract obstruction in the mouse: the kinetics of distal nephron injury*. Lab Invest, 2013. **93**(9): p. 1012-23.
73. Huang, W.Y., et al., *Renal biopsy in congenital ureteropelvic junction obstruction: evidence for parenchymal maldevelopment*. Kidney Int, 2006. **69**(1): p. 137-43.
74. Josephson, S., et al., *Experimental obstructive hydronephrosis in newborn rats. I. Surgical technique and long-term morphologic effects*. Invest Urol, 1980. **17**(6): p. 478-83.
75. Thornhill, B.A., et al., *Glomerulotubular disconnection in neonatal mice after relief of partial ureteral obstruction*. Kidney Int, 2007. **72**(9): p. 1103-12.
76. Martínez-Klimova, E., et al., *Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments*. Biomolecules, 2019. **9**(4).
77. Chevalier, R.L., *The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(1): p. F145-61.
78. Ucero, A.C., et al., *Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction*. Int Urol Nephrol, 2014. **46**(4): p. 765-76.
79. Alikhan, M.A. and S.D. Ricardo, *Mononuclear phagocyte system in kidney disease and repair*. Nephrology (Carlton), 2013. **18**(2): p. 81-91.
80. Gasparitsch, M., et al., *RAGE-mediated interstitial fibrosis in neonatal obstructive nephropathy is independent of NF- κ B activation*. Kidney Int, 2013. **84**(5): p. 911-9.
81. Immel, R., et al., *Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 588245.
82. Lange-Sperandio, B., et al., *Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice*. Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 516-24.
83. Duffield, J.S., *Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2299-306.
84. Campanholle, G., et al., *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **304**(7): p. C591-603.

85. LeBleu, V.S., et al., *Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 1047-53.
86. Popper, B., et al., *Neonatal obstructive nephropathy induces necroptosis and necroinflammation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 18600.
87. Pang, J. and J.E. Vince, *The role of caspase-8 in inflammatory signalling and pyroptotic cell death*. Semin Immunol, 2023. **70**: p. 101832.
88. Galluzzi, L., et al., *Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis*. Immunity, 2016. **44**(2): p. 221-31.
89. Boor, P., T. Ostendorf, and J. Floege, *PDGF and the progression of renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29 Suppl 1**: p. i45-i54.
90. Ostendorf, T., F. Eitner, and J. Floege, *The PDGF family in renal fibrosis*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(7): p. 1041-50.
91. Ostendorf, T., et al., *Platelet-derived growth factors (PDGFs) in glomerular and tubulointerstitial fibrosis*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. **4**(1): p. 65-69.
92. Lin, S.L., et al., *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1617-27.
93. Humphreys, B.D., et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 85-97.
94. Smith, S.W., et al., *Kidney pericytes: a novel therapeutic target in interstitial fibrosis*. Histol Histopathol, 2012. **27**(12): p. 1503-14.
95. Gasparitsch, M., et al., *Tyrphostin AG490 reduces inflammation and fibrosis in neonatal obstructive nephropathy*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226675.
96. Lange-Sperandio, B., et al., *Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 861-71.
97. Vielhauer, V., et al., *Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(6): p. 1173-1187.
98. Wyczanska, M., et al., *TLR2 mediates renal apoptosis in neonatal mice subjected experimentally to obstructive nephropathy*. PLoS One, 2023. **18**(11): p. e0294142.
99. Anders, H.J., et al., *A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 251-9.
100. Wyczanska, M., et al., *Interleukin-10 enhances recruitment of immune cells in the neonatal mouse model of obstructive nephropathy*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 5495.
101. Rovin, B.H. and L.T. Phan, *Chemotactic factors and renal inflammation*. Am J Kidney Dis, 1998. **31**(6): p. 1065-84.

102. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlöndorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 152-176.
103. Morrissey, J.J. and S. Klahr, *Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis*. Am J Physiol, 1998. **274**(3): p. F580-6.
104. Tapmeier, T.T., et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 351-62.
105. Liu, L., et al., *CD4+ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis*. Am J Nephrol, 2012. **36**(4): p. 386-96.
106. Gieseck, R.L., 3rd, M.S. Wilson, and T.A. Wynn, *Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 62-76.
107. Tang, P.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(3): p. 144-158.
108. Nishida, M. and K. Hamaoka, *Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy*. Nephron Exp Nephrol, 2008. **110**(1): p. e31-6.
109. Chevalier, R.L., *Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(2): p. 153-60.
110. Diamond, J.R., *Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(1): p. 133-40.
111. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(1): p. 21-7.
112. Long, H., et al., *Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes account for organ injury, regeneration or atrophy*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1194988.
113. Cao, Q., Y. Wang, and D.C. Harris, *Pathogenic and protective role of macrophages in kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(1): p. F3-11.
114. Duffield, J.S., *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 234-54.
115. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 288-98.
116. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(9): p. 915-925.
117. El-Nahas, A.M., *Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring*. Kidney Int, 2003. **64**(5): p. 1553-63.
118. Salei, N., et al., *The Kidney Contains Ontogenetically Distinct Dendritic Cell and Macrophage Subtypes throughout Development That Differ in Their Inflammatory Properties*. J Am Soc Nephrol, 2020. **31**(2): p. 257-278.

119. Belliere, J., et al., *Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(6): p. 1363-77.
120. Calle, P., et al., *Infusion of Phagocytic Macrophages Overexpressing CPT1a Ameliorates Kidney Fibrosis in the UUO Model*. Cells, 2021. **10**(7).
121. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
122. Mossadegh-Keller, N., et al., *Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations*. J Exp Med, 2017. **214**(10): p. 2829-2841.
123. Cachat, F., et al., *Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 564-75.
124. Forbes, M.S., et al., *Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(1): p. F120-9.
125. Truong, L.D., et al., *Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy*. Semin Nephrol, 1998. **18**(6): p. 641-51.
126. Nadasdy, T., et al., *Tubular atrophy in the end-stage kidney: a lectin and immunohistochemical study*. Hum Pathol, 1994. **25**(1): p. 22-8.
127. Calderon-Margalit, R., et al., *History of Childhood Kidney Disease and Risk of Adult End-Stage Renal Disease*. N Engl J Med, 2018. **378**(5): p. 428-438.
128. Boi, R., K. Ebefors, and J. Nyström, *The role of the mesangium in glomerular function*. Acta Physiol (Oxf), 2023. **239**(2): p. e14045.
129. Ren, K.Y., et al., *Glomerular macrophage proliferation in experimental immune complex nephritis*. Clin Immunol Immunopathol, 1991. **60**(3): p. 384-98.
130. Le Meur, Y., et al., *Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-fms pathway*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(3): p. 530-7.
131. Deng, X., et al., *CSF-1R inhibition attenuates ischemia-induced renal injury and fibrosis by reducing Ly6C(+) M2-like macrophage infiltration*. Int Immunopharmacol, 2020. **88**: p. 106854.
132. Truong, L.D., et al., *Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy*. Kidney Int, 1996. **50**(1): p. 200-7.
133. Shin, G.T., et al., *Effects of suppressing intrarenal angiotensinogen on renal transforming growth factor-beta1 expression in acute ureteral obstruction*. Kidney Int, 2005. **67**(3): p. 897-908.
134. Miyajima, A., et al., *Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2301-13.
135. Galarreta, C.I., et al., *Transforming growth factor-β1 receptor inhibition preserves glomerulotubular integrity during ureteral obstruction in adults but worsens injury in neonatal mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(5): p. F481-90.

136. Chen, C.O., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition aggravates renal interstitial injury resulting from partial unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(3): p. F946-55.
137. Coleman, C.M., et al., *Angiotensin AT1-receptor inhibition exacerbates renal injury resulting from partial unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(1): p. F262-8.
138. Chevalier, R.L., et al., *Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 2033-43.
139. Forbes, M.S., et al., *Chronic unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse delays maturation of both kidneys and leads to late formation of atubular glomeruli*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(12): p. F1736-46.
140. Lenda, D.M., et al., *Reduced macrophage recruitment, proliferation, and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3254-62.
141. Lange-Sperandio, B., et al., *Macrophages induce apoptosis in proximal tubule cells*. Pediatr Nephrol, 2003. **18**(4): p. 335-41.
142. Lange-Sperandio, B., et al., *Distinct roles of Mac-1 and its counter-receptors in neonatal obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2006. **69**(1): p. 81-8.
143. Ricardo, S.D. and J.R. Diamond, *The role of macrophages and reactive oxygen species in experimental hydronephrosis*. Semin Nephrol, 1998. **18**(6): p. 612-21.
144. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
145. Duffield, J.S., et al., *Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2110-9.
146. Yoo, K.H., et al., *Inducible nitric oxide synthase modulates hydronephrosis following partial or complete unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(1): p. F62-71.
147. Leung, J.C., et al., *Combined blockade of angiotensin II and prorenin receptors ameliorates podocytic apoptosis induced by IgA-activated mesangial cells*. Apoptosis, 2015. **20**(7): p. 907-20.
148. López-Hernández, F.J. and J.M. López-Novoa, *Role of TGF-β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects*. Cell Tissue Res, 2012. **347**(1): p. 141-54.
149. Shankland, S.J., J.W. Pippin, and J.S. Duffield, *Progenitor cells and podocyte regeneration*. Semin Nephrol, 2014. **34**(4): p. 418-28.
150. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
151. Shirazi, M., et al., *Evaluation of Caspase 3 Enzyme and TNF-alpha as Biomarkers in Ureteropelvic Junction Obstruction in Children- a preliminary report*. Pak J Med Sci, 2017. **33**(2): p. 315-319.

152. Klaus, R. and B. Lange-Sperario, *Biomarker bei ureteropelviner Stenose: Rück- und Ausblick*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2023. **171**(1): p. 20-28.
153. Louis, K. and A. Hertig, *How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis?* World J Nephrol, 2015. **4**(3): p. 367-73.
154. Nikolic-Paterson, D.J., S. Wang, and H.Y. Lan, *Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. **4**(1): p. 34-38.
155. Wang, Y.Y., et al., *Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(7): p. 2053-2067.
156. Meng, X.M., et al., *Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis*. Cell Death Dis, 2016. **7**(12): p. e2495.
157. Piera-Velazquez, S., F.A. Mendoza, and S.A. Jimenez, *Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases*. J Clin Med, 2016. **5**(4).
158. Yan, J., et al., *JAK3/STAT6 Stimulates Bone Marrow-Derived Fibroblast Activation in Renal Fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(12): p. 3060-71.
159. Floege, J., F. Eitner, and C.E. Alpers, *A new look at platelet-derived growth factor in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(1): p. 12-23.
160. Klinkhammer, B.M., J. Floege, and P. Boor, *PDGF in organ fibrosis*. Mol Aspects Med, 2018. **62**: p. 44-62.
161. Chen, Y.T., et al., *Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(11): p. 1170-81.
162. Buhl, E.M., et al., *The role of PDGF-D in healthy and fibrotic kidneys*. Kidney Int, 2016. **89**(4): p. 848-61.
163. Kuppe, C., et al., *Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis*. Nature, 2021. **589**(7841): p. 281-286.
164. Picard, N., et al., *Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(1): p. 141-55.
165. Chevalier, R.L., et al., *Responses of proximal tubular cells to injury in congenital renal disease: fight or flight*. Pediatr Nephrol, 2014. **29**(4): p. 537-41.
166. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, and R.L. Chevalier, *Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(1): p. F110-7.
167. Bundesministerium der Justiz. *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV)*. 2021, August 11; Available from: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>.
168. Tannenbaum, J. and B.T. Bennett, *Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015. **54**(2): p. 120-32.

169. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959, London: Methuen & Co. Ltd.
170. Atkinson, J., et al., *Refining the unilateral ureteral obstruction mouse model: No sham, no shame*. Lab Anim, 2021. **55**(1): p. 21-29.
171. Li, Z., et al., *Prediction of the outcome of antenatal hydronephrosis: significance of urinary EGF*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(12): p. 2251-9.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufige Formen der konnatalen obstruktiven Uropathien und ihre Lokalisation: oberer Harntrakt: ureteropelvine Stenose, primär obstruktiver Megaureter, unterer Harntrakt: posteriore Urethralklappen, modifiziert nach [3, 4].....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der sonographischen Gradeinteilung der Hydronephrose, modifiziert nach [1, 2].....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Nephrogenese und Obstruktion bei UPS beim Menschen (oben) bzw. UUO bei der Maus (unten). Die Obstruktion tritt im gleichen Zeitraum der Nephrogenese auf.	18
Abbildung 4: Schematische Übersichtsdarstellung über Geburt, Operation und Organentnahme.....	23
Abbildung 5: Immunhistochemische CD3-Färbung (Pfeile) am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400.....	35
Abbildung 6: Morphometrische Analyse der Infiltration von CD3-positiven T-Lymphozyten in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen (IO) neonatalen Mausnieren an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW ± SE; *p<0,05 UUO vs Sham	36
Abbildung 7: Immunhistochemische Galectin-3-Färbung am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400.....	37
Abbildung 8: Morphometrische Analyse der Infiltration von Galectin-3-positiven Makrophagen pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW ± SE; *p<0,05 UUO vs Sham.....	38
Abbildung 9: Immunhistochemische Ki-67-Färbung am 14. Lebenstag (d14) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400.....	39

Abbildung 10: Morphometrische Analyse der Ki-67 positive Zellen pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren tubulär, interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham	41
Abbildung 11: TUNEL-Färbung neonataler Mausnieren am 14. Lebenstag (d14) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400.....	42
Abbildung 12: Morphometrische Analyse apoptotischer Zellen (TUNEL-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) neonatalen Mausnieren tubulär, interstitiell und glomerulär an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham	44
Abbildung 13: α -SMA-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO), Vergrößerung x 400.....	45
Abbildung 14: Morphometrische Analyse der Myofibroblasten-positiven Felder (α -SMA-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen Nieren (IO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham	46
Abbildung 15: Morphometrische Analyse der Myofibroblasten-positiven Felder (α -SMA-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO), kontralateralen (IO) und scheinoperierten (Sham) Nieren neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham	47
Abbildung 16: Masson-Trichrome-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO) x 400	48
Abbildung 17: Morphometrische Analyse Kollagen-positiver Felder (Masson-Trichrome-Färbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO) und kontralateralen Nieren (IO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21 bezogen auf die scheinoperierte Kontrollgruppe (Sham); n=8 pro Gruppe; MW \pm SE; *p<0,05 UUO vs Sham	49

Abbildung 18: Morphometrische Analyse Kollagen-positiver Felder (Masson Trichromefärbung) pro Gesichtsfeld in den ureterligierten (UUO), kontralateralen (IO) und scheinoperierten (Sham) Nieren neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW ± SE; *p<0,05 UUO vs Sham	49
Abbildung 19: PAS-Färbung neonataler Mausnieren am 21. Lebenstag (d21) nach (A) Scheinoperation (Sham) und (B) unilateraler Ureterligatur (UUO) x 400	50
Abbildung 20: Morphometrische Analyse atrophierter proximaler und distaler Tubuli (PAS-Färbung) in 20 Gesichtsfeldern in den ureterligierten Nieren (UUO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW ± SE; *p<0,05 UUO vs Sham	52
Abbildung 21: Morphometrische Analyse atrophierter proximaler und distaler Tubuli (PAS-Färbung) in 20 Gesichtsfeldern in den ureterligierten Nieren (UUO) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21; n=8 pro Gruppe; MW ± SE; *p<0,05	52
Abbildung 22: Galectin-3-Expression in ureterligierten Nieren (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham.....	53
Abbildung 23: Expression von Caspase-8 in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham.....	54
Abbildung 24: Expression von α -SMA in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham.....	56
Abbildung 25: Expression von PDGFR- β in ureterligierten (UUO) und scheinoperierten Nieren (Sham) neonataler Mäuse an d3, d7, d14 und d21, n=3 pro Gruppe; *p<0,05 UUO vs Sham.....	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung für immunhistochemische und histochemische Untersuchungen und Western Blots	23
Tabelle 2: CD3-positive T-Lymphozyten als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham).....	35
Tabelle 3: Galectin-3-positive Makrophagen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)	37
Tabelle 4: Ki-67-positive tubuläre Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)	39
Tabelle 5: Ki-67-positive interstitielle Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)	40
Tabelle 6: Ki-67-positive glomeruläre Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und scheinoperierten Kontrollen (Sham)	40
Tabelle 7: Tubuläre Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den Tubuli ureterligierter Nieren (UUO), in den kontralateralen Nieren (IO) und den Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham).....	42
Tabelle 8: Interstitielle Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung im Interstitium ureterligierter Nieren (UUO), kontralateraler Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham) ...	43
Tabelle 9: Glomeruläre Apoptose. TUNEL-positive Zellen pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den Glomeruli ureterligierter Nieren (UUO), kontralateraler Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham).....	43
Tabelle 10: α -SMA-positive Felder pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham).....	45

Tabelle 11: Kollagen-positive Felder (Masson-Trichrome-Färbung) pro Gesichtsfeld als Mittelwerte ± Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren der scheinoperierten Kontrollen (Sham).....	48
Tabelle 12: Tubuläre Atrophie in proximalen und distalen Tubuli (PAS-Färbung) als Mittelwerte ± Standardabweichung in den ureterligierten Nieren (UUO), kontralateralen Nieren (IO) und Nieren scheinoperierter Kontrollen (Sham).....	51

Publikationen

Fachartikel

Popper, B., Rammer, M., Gasparitsch, M., Singer, T., Keller, U., Döring, Y., Lange-Sperandio, B., *Neonatal obstructive nephropathy induces necroptosis and necroinflammation*. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 18600

Singer, T., Rohde, C., Lieftüchter, V., Habicht, S., *Atemnot bei Säuglingen, Kleinkindern und Schulkindern*. Notfall Rettungsmed 2024, 27:568-575

Singer, T., Jung, P., Hoffmann, F., „*Eckpunktepapier 2025 zur notfallmedizinischen Versorgung der Bevölkerung in Klinik und Prälklinik*“ – *Pädiatrische Aspekte der präklinischen Versorgung*, unveröffentlicht

Vorträge und Poster

Singer, T., Gasparitsch, M., Keller, U., Lange-Sperandio, B., *Zirkulierende M2-Makrophagen und T-Zellen infiltrieren die Niere im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie*. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie 2015 Berlin

Singer, T., *Zirkulierende M2-Makrophagen und T-Zellen infiltrieren die neonatale Niere nach unilateraler Ureterligatur*. Nephrologisches Forum München - 211. Sitzung Fellow's Night 2015

Grosse, L., Singer, T., Lieftüchter, V., Gerstl, L., Borggraefe, I., Reiter, K., Olivieri, M., Hoffmann, F., *Eisenmangelanämie, Thrombozytose und arteriell ischämischer Schlaganfall*. 21. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin 2021, virtuell

Singer, T., Schön, C., Hey, F., Hoffmann, F., Jakob, A., Dalla-Pozza R., Schwerk, N., Grieser, M., Reiter, K., *Interventionelle Bronchoskopie bei persistierendem Pneumothorax: Bronchiale Okklusion mit Amplatzer-Device*. 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin 2022, Aachen

Lieftüchter, V., Jung, E., Hey, F., Rohde, C., Singer, T., Hoffmann, F., Schön, C., Reiter, K., Anger, M., Knoflach, K., Schober, T., Hübner, J., Paolini, M., Gerstl, L., Olivieri, M., *Wenn Seltenes noch seltener ist – eine mögliche Ursache für eine Strokesymptomatik*. 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie 2024, Stuttgart

Danksagung

Ich danke herzlich Frau Prof. Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie ihre äußerst engagierte, kompetente und freundliche Unterstützung und Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit wie auch darüber hinaus auf meinem beruflichen Weg zur Pädiatrie.

Dem ganzen Team des nephrologischen Labors des Dr. von Haunerschen Kinderspitals möchte ich für die großartige Einarbeitung und unermüdliche Hilfestellung bei der experimentellen Arbeit danken, insbesondere Mojca Gasparitsch und Ursula Keller.

Des Weiteren danke ich von Herzen allen meinen Freundinnen und Freunden, Kolleginnen und Kollegen und meiner Familie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen während dieser Arbeit.

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Inflammation und Fibrose im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Teresa Singer

München, den 15.12.2025

.....
Teresa Singer

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Inflammation und Fibrose im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Teresa Singer

München, den 15.12.2025

.....
Teresa Singer