

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität-München



***Der Effekt vom intravenösen Glu-Plasminogen auf
Cholesterinkristallembolie-bedingte thrombotische Angiopathie
und akute Nierenschädigung***

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

vorgelegt von
Lyuben Slavov Lyubenov

aus
Vidin, Bulgarien

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Zweites Gutachten: Prof. Dr. med. Volker Vielhauer

Drittes Gutachten: Prof. Dr. med. Wolfgang Neuhofer

Weitere Gutachten: Prof. Dr. med. Peter Weyrich

Promovierte Mitbetreuerin: Prof. Martha Merrow, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung (Deutsch):	5
Abstract (English):	8
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis	14
2. Einleitung	16
2.1 Die akute Nierenschädigung.....	16
2.2 Cholesterinkristallembolie	20
2.2.1 Pathogenese der Cholesterinkristallembolie	23
2.2.2 Renale Cholesterinkristallembolie.....	25
2.3 Therapie der Cholesterinkristallembolie	28
2.3.1 Experimentelle in vivo Therapiemethoden.....	28
2.3.2 Klinische Behandlungsmethoden.....	31
2.4 Plasminogen - Eigenschaften und Therapiepotenzial	33
2.4.1 Plasminogen - Struktur und Funktion	33
2.4.2 Thrombolytische Therapie und Plasminogen	35
2.4.3 Glu-Plasminogen und Lys-Plasminogen.....	37
2.5 Hypothese	39
3. Material	41
4. Methoden	44
4.1 Tierexperimentelle Methoden	44
4.1.1 Tierhaltung	44
4.1.2 Aufbereitung der Cholesterinkristalllösung	44
4.1.3 Aufbereitung und Applikation vom Plasminogen und PBS-Puffer	45
4.1.4 Induktion der renalen Cholesterinkristallembolie	45
4.1.5 Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)	47
4.1.6 Nierenentnahme	48
4.2 Histologische Methoden.....	49
4.2.1 Nierenaufbereitung und Herstellung von Präparaten	49
4.2.2 Histologische Färbungen	50
4.3 Design von experimentellen Teilstudien	56

4.3.1	Teilstudie 1 - Zeitdynamik der Thromboseentwicklung.....	56
4.3.2	Teilstudie 2 - Einsatz vom Glu-Plasminogen	58
4.3.3	Teilstudie 3 - Zeitdynamik der Thrombolyse	59
4.3.4	Teilstudie 4 - humanes Glu-Plasminogen und Lys-Plasminogen	60
4.4	Statistische Auswertung.....	61
5.	Ergebnisse.....	62
5.1	Zeitdynamik der CCE-bedingten akuten Nierenschädigung.....	62
5.1.1	GFR-Abfall und Mikrothromboseformation infolge von CCE	62
5.1.2	Zeitverlauf der CCE-induzierten Nierenschädigung	65
5.2	Thrombolytische Wirkung vom Glu-Plasminogen.....	70
5.2.1	Humanes Glu-Plasminogen	71
5.2.2	Murines Glu-Plasminogen.....	81
5.3	Wirkungsdynamik vom Glu-Plasminogen	88
5.3.1	Wirkungsdynamik vom Glu-Plasminogen auf die GFR.....	88
5.3.2	Zeitdynamik der Thrombolyse nach Glu-Plasminogengabe	89
5.3.3	Zeitdynamik der Nierenschäden nach Glu-Plasminogengabe	91
5.4	Interaktion zwischen Lys- und Glu-Plasminogen.....	98
5.4.1	Auswirkung auf den Nierenfunktionsverlust	98
5.4.2	Auswirkung auf CCE-verursachte Gefäßobstruktionen	99
5.4.3	Auswirkung auf ischämische Nierenschäden	101
6.	Diskussion	106
6.1	Therapiefenster in der Thrombosetherapie	107
6.2	Thrombolytische Therapien	111
6.3	Plasminogen in der Therapie von CC-Thrombosen	114
6.4	Limitationen der Arbeit	118
	Literaturverzeichnis	120
	Danksagung	135
	Eidesstattliche Versicherung	136
	Lebenslauf	137
	Publikationsverzeichnis	138

1. Zusammenfassung

Die akute Nierenschädigung (ANS) ist ein weitverbreitetes Krankheitsbild, das verschiedene Ursachen haben kann und mit einem rapiden Abfall der exkretorischen Nierenfunktion einhergeht. Eine seltene Ursache für ANS ist die Cholesterinkristallembolie (CCE). CCE entsteht typischerweise als Folge von fortgeschrittener Atherosklerose. CCE wird typischerweise durch die Freisetzung von Cholesterinkristallen aus atheromatösen Plaques nach einer Plaqueruptur hervorgerufen. Diese Kristalle werden in periphere Gefäße verschleppt, wo sie embolisieren und schließlich Gefäßobstruktionen verursachen. Laut Biopsien sind die Kristalle im Gefäßlumen von einer biologischen Matrix umgeben, die aus Thrombozyten, extrazellulärer DNA, Neutrophilen und Fibrin besteht. CCE ist eine mit hoher Letalität verbundene Erkrankung mit zurzeit eingeschränkten Therapieoptionen.

Laut Studien werden intrinsische Plasminogenvorräte während Situationen mit erhöhtem Plasminogenverbrauch ausgeschöpft, was in einer herabgesetzten Fibrinolyse, persistierenden Thrombosen und Gefäßobstruktionen resultieren kann. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass eine rechtzeitige Supplementierung des Plasma-Plasminogenspiegels nach CCE die Fibrinolyse aufrechterhalten und somit thrombotische Angiopathien, Nierenfunktionsverlust und ischämische Nierenschäden verhindern kann. Zu diesem Zweck sollte ein Therapiefenster etabliert werden, sowie verschiedenen Konzentrationen von murinem und humanen Plasminogen untersucht werden. Weil Plasminogen in zwei distinkten Konformationen vorkommen kann, nämlich Glu-Plasminogen und Lys-Plasminogen, sollte auch der Effekt von verschiedenen Mischungsverhältnissen aus beiden Plasminogenarten untersucht werden.

Eine CCE wurde anhand von einer intraarteriellen Injektion von Cholesterinkristalllösung (10 mg/kg) in die linke *A. renalis* von gesunden C57BL/6J-Mäusen induziert. Der primäre Endpunkt war die glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Diese wurde an wachen und freibeweglichen Tieren bestimmt, um den Abfall der exkretorischen Nierenfunktion zu

verfolgen. Als sekundäre Endpunkte wurden die Zahl der arteriellen Obstruktionen, die Zahl der CD31+ Endothelzellen, die Neutrophileninfiltration und die ischämischen Nierenschäden definiert.

Die Injektion von Cholesterinkristallen (CC) in die linke *A. renalis* verursachte nach 18 h einen ca. 40% Abfall der GFR, begleitet von einer thrombotischen Angiopathie, einem Verlust der CD31+ Mikrovaskulatur, einer Neutrophileninfiltration und ischämischen Nierenschäden. Es zeigte sich zudem eine progrediente Zunahme der Zahl der Gefäßobstruktionen in den *Ae. interlobares*, *Ae. arcuatae* und *Ae. interlobulares*. Hierbei begann die Ausbreitung der Thrombosen in den kleinen *Ae. interlobulares* bereits 2 bis 4 h nach der CC-Injektion. Zum 12 h-Zeitpunkt wurde eine erhöhte Zahl von kompletten Obstruktionen auch in den *Ae. interlobares* registriert. Dies zeigte, dass der Einsatz vom Plasminogen möglichst früh beginnen sollte, vorzugsweise innerhalb von 4 Stunden, um die Perfusion der Glomeruli wiederherzustellen und die Spätfolgen von CCE zu vermeiden.

Die Behandlung mit humanem und murinem Glu-Plasminogen erfolgte jeweils 4 Stunden nach der Injektion von CC in die Nierenarterie. Das Medikament wurde intravenös verabreicht. 24 h nach der CC-Injektion konnte bei mit humanem Glu-Plasminogen behandelten Mäusen eine dosisabhängige Wiederherstellung der GFR, eine Reduktion der Obstruktionszahlen in allen Nierenarterien und einen Rückgang von ischämischen Schäden beobachtet werden. Dieser Effekt konnte jedoch bei mit murinem Glu-Plasminogen behandelten Tieren nicht repliziert werden.

Eine Untersuchung der Zeitdynamik der Glu-Plasminogen-vermittelten thrombolytischen Wirkung erfolgte mithilfe einer intravenösen Injektion von 0,6 mg/kg Glu-Plasminogen 4 h nach der CC-Injektion. Bei der Analyse von Gefäßobstruktionen zeigte sich in diesem Dosisbereich eine lediglich transitorische Wirkung auf die Entwicklung von Thrombosen. Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Bestimmung von GFR und Beurteilung von ischämischen Schäden nicht erreicht werden, wobei hier kein signifikanter Einfluss im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen nachgewiesen wurde.

Um die Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf die Thrombolyse zu untersuchen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse vom Lys-Plasminogen und Glu-Plasminogen in einem Kombinationspräparat 4 h nach der CC-Injektion intravenös verabreicht. Dabei zeigte sich mit Erhöhung des Lys-Plasminogen-Anteils eine erhöhte Rate an arteriellen Gefäßobstruktionen. Dies könnte durch das bessere Wirkungsprofil vom Glu-Plasminogen bedingt sein.

Zusammengenommen wurde anhand dieser Studie demonstriert, dass eine rechtzeitige Applikation vom Glu-Plasminogen in diesem Mausmodell der CCE dosisabhängig thrombotische Angiopathien, Nierenfunktionsverlust und ischämische Nierenschäden vorbeugen kann. Dies, zusammen mit dem Fehlen von Blutungskomplikationen während der Studie, könnte für die Eignung vom Glu-Plasminogen als potenzielles therapeutisches Mittel in der Behandlung von CCE sprechen.

Abstract (English)

Acute kidney injury is a relatively common condition which can develop from multiple underlying causes. It is usually associated with a rapid decline in renal excretory output and reduced creatinine clearance. Cholesterol crystal embolism (CCE) stands as one potential cause of acute kidney injury. CCE develops as a complication of advanced atherosclerosis. It is caused by the release of cholesterol crystals (CC) from atherosclerotic plaques upon plaque rupture, either spontaneously or through iatrogenic stimuli. The cholesterol crystals are then carried to the peripheral blood vessels, where they cause embolisms, which could lead to a variety of complications depending on the exact localization. Biopsies show cholesterol crystals surrounded by a biological matrix, which later studies showed to be composed of platelets, fibrin, extracellular DNA and neutrophils. In general, patients diagnosed with CCE have a high mortality rate, partially because no therapeutic options are available for this condition.

Several studies show that a depletion of intrinsically available plasminogen can occur in situations of increased consumption, such as during thrombus formation and fibrinolysis. This depletion could lead to a reduced fibrinolytic activity, thereby causing persisting thrombosis and vascular obstructions. We therefore hypothesized that a timely supplementation of intrinsic plasminogen levels with extrinsic plasminogen could support thrombolytic activity, thus preventing thrombotic angiopathy, loss of kidney function and ischemic kidney injury. For this purpose, it was necessary to establish a therapeutic window of opportunity as well as testing different concentrations of human and murine plasminogen. As plasminogen has two distinct conformations, namely Lys-plasminogen and Glu-plasminogen, I also examined the effect of different ratios of the two plasminogen types on thrombolytic activity.

We induced CCE via an injection of cholesterol crystal solution (10 mg/kg) into the left renal artery of healthy C57BL/6J mice. The primary endpoint of the study was the glomerular filtration rate (GFR), which we measured on conscious and freely moving animals, thus determining the level of kidney function at different time points.

Additionally, the number of obstructed arteries, the number of CD31-positive endothelial cells, the level of neutrophil infiltration, as well as the severity of ischemic kidney injury were determined as secondary endpoints for the study.

The injection of CC into the renal artery caused a 40 percent decline in GFR after 18 hours. This was accompanied by thrombotic angiopathy, the loss of CD31-positive microvasculature, increased kidney neutrophil infiltration and ischemic injury. A progressive increase in obstructions in interlobar, arcuate and interlobular kidney arteries was also registered. Thrombus formation in interlobular arteries was already visible 2 to 4 hours after the CC injection, followed by complete obstructions of arcuate and interlobar arteries by the 12-hour time-point. This showed the need for a relatively prompt administration of plasminogen to protect glomerular perfusion to avoid subsequent complications of CCE.

To determine the thrombolytic efficacy of murine and human Glu-plasminogen, we administered different doses intravenously 4 hours after the intraarterial CC injection. In mice treated with human Glu-Plasminogen a dose-dependent recovery of GFR, we observed a reduction of arterial obstruction and a positive effect on ischemic kidney injury. However, this effect did not be replicate in animals treated with murine Glu-Plasminogen.

An analysis of the time dynamic of the thrombolytic effects of Glu-plasminogen was performed using the 0.6 mg/kg dose. The administration of this dosage 4 hours after inducing CCE managed to achieve a solely transitory effect on arterial thrombus formation. However, this dosage was not able to significantly impact the GFR loss or the progression of ischemic kidney injury.

To determine the potential effect of Lys-Plasminogen on the thrombolytic activity, we applied different ratios of Lys-Plasminogen and Glu-Plasminogen were 4 hours after the induction of CCE. On examination the kidneys of mice treated with higher Lys-Plasminogen ratios showed an increase in the number of arterial obstructions compared

to those treated with higher ratios of Glu-Plasminogen. This may relate to a better thrombolytic efficacy of Glu-Plasminogen.

In conclusion this study was able to demonstrate the ability of Glu-Plasminogen to prevent thrombotic angiopathy, loss of kidney function and ischemic kidney injury in this mouse model of CCE. This, in addition to the lack of hemorrhagic complications observed during the study, could show the potential of Glu-Plasminogen in the treatment of patients affected by CCE.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen der Akuten Nierenschädigung.....	18
Abbildung 2: Folgen der Cholesterinkristallembolie.....	22
Abbildung 3: Intraluminale Cholesterinkristallthrombusbildung.....	26
Abbildung 4: Ablauf der Fibrinolyse.....	34
Abbildung 5: Aktivationsmechanismen vom nativen Glu-Plasminogen.....	38
Abbildung 6: Operative Induktion von Cholesterinkristallembolie.....	47
Abbildung 7: Bestimmung der GFR.....	48
Abbildung 8: Beurteilung vom Arterientyp und Obstruktionsgrad.....	52
Abbildung 9: Beurteilung vom Nierenschaden mittels PAS-Färbung.....	54
Abbildung 10: Auswertung der Mikrovaskulaturviabilität mittels der CD31-Färbung.....	55
Abbildung 11: Auswertung der Neutrophileninfiltration mittels der Ly6B-Färbung.....	56
Abbildung 12: Versuchsaufbau von Teilstudie 1.....	57
Abbildung 13: Versuchsaufbau von Teilstudie 2.....	59
Abbildung 14: Versuchsaufbau von Teilstudie 3.....	60
Abbildung 15: Versuchsaufbau von Teilstudie 4.....	61
Abbildung 16: Zeitdynamik des GFR-Verlusts nach CCE.....	62
Abbildung 17: Dynamik der Thrombusbildung nach CCE (graphische Darstellung).....	63
Abbildung 18: Dynamik der Thrombusbildung nach CCE (repräsentative Bilder).....	64
Abbildung 19: Makroskopische Aufnahme von einer durch CCE betroffenen Niere.....	65
Abbildung 20: Zeitverlauf des Nierenschadens nach CCE (graphische Darstellung).....	66
Abbildung 21: Zeitverlauf des Nierenschadens nach CCE (repräsentative Bilder).....	67
Abbildung 22: Verlust der CD31+ Mikrovaskulatur infolge von CCE.....	68
Abbildung 23: Zeitdynamik der Neutrophileninfiltration nach CCE (graphische Darstellung).....	69
Abbildung 24: Zeitdynamik der Neutrophileninfiltration nach CCE (repräsentative Bilder).....	70
Abbildung 25: Dosisabhängige Auswirkung vom Hu Glu-PLG auf die GFR 24 h nach CCE.....	71
Abbildung 26: Thrombolytische Wirkung vom humanen Glu-Plasminogen (graphische Darstellung).....	72
Abbildung 27: Thrombolytische Wirkung vom humanen Glu-Plasminogen (repräsentative Bilder).....	73
Abbildung 28: Makroskopische Nierenaufnahmen (Hu Glu-Plasminogen).....	74
Abbildung 29: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden (graphische Darstellung).....	75
Abbildung 30: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden (repräsentative Bilder).....	76
Abbildung 31: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust (graphische Darstellung).....	77
Abbildung 32: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust (repräsentative Bilder).....	78

Abbildung 33: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (graphische Darstellung).....	79
Abbildung 34: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (repräsentative Bilder).....	80
Abbildung 35: Auswirkung vom murinen Glu-PLG auf die GFR 24 h nach CCE.....	81
Abbildung 36: Thrombolytische Wirkung vom murinen Glu-Plasminogen (graphische Darstellung).....	82
Abbildung 37: Thrombolytische Wirkung vom murinen Glu-Plasminogen (repräsentative Bilder).....	83
Abbildung 38: Makroskopische Nierenaufnahmen (Mu Glu-Plasminogen).....	84
Abbildung 39: Effekt vom murinen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden.....	85
Abbildung 40: Effekt vom murinen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust.....	86
Abbildung 41: Effekt vom murinen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration.....	87
Abbildung 42: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf die GFR.....	89
Abbildung 43: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf Gefäßobstruktionen (graphische Darstellung).....	89
Abbildung 44: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf Gefäßobstruktionen (repräsentative Bilder).....	90
Abbildung 45: Makroskopische Nierenaufnahmen nach Hu Glu-PLG (0,6 mg/kg)-Behandlung.....	91
Abbildung 46: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Nierenschäden (graphische Darstellung).....	92
Abbildung 47: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Nierenschäden (repräsentative Bilder).....	93
Abbildung 48: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Mikrovaskulaturschäden (graphische Darstellung).....	94
Abbildung 49: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Mikrovaskulaturschäden (repräsentative Bilder).....	95
Abbildung 50: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (graphische Darstellung).....	96
Abbildung 51: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (repräsentative Bilder).....	97
Abbildung 52: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingten GFR-Verlust.....	98
Abbildung 53: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Gefäßobstruktionen (graphische Darstellung).....	99
Abbildung 54: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Gefäßobstruktionen (repräsentative Bilder).....	100
Abbildung 55: Makroskopische Nierenaufnahmen nach Behandlung mit Lys-PLG/Glu-PLG.....	101
Abbildung 56: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden.....	102
Abbildung 57: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf den CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust.....	103
Abbildung 58: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf die CCE-bedingte Neutrophileninfiltration.....	104
Abbildung 59: Der thrombolytische Effekt vom humanen Glu-Plasminogen.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von ANS-Stadien nach KDIGO.....	16
Tabelle 2: Quantifizierung arterieller Obstruktionen.....	51
Tabelle 3: Evaluierung vom Nierenstrukturschaden.....	53
Tabelle 4: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 1.....	57
Tabelle 5: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 2 (humanes Glu-Plasminogen).....	58
Tabelle 6: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 2 (murines Glu-Plasminogen).....	59
Tabelle 7: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 3.....	60
Tabelle 8: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 4.....	61

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Voller Name
Abb.	Abbildung
ANS	Akute Nierenschädigung
α SMA	Alpha-smooth muscle actin
CC	Cholesterinkristalle
CCE	Cholesterinkristallembolie
CD31	cluster of differentiation 31
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
FDP	fibrin degradation product
FITC	Fluoresceinthioisocyanat
G	Gauge
GBM	glomerular basement membrane
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
Glu-PLG	Glu-Plasminogen
HCl	Wasserstoffchlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMincle	human macrophage-inducible C-type lectin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilo-Dalton
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes

Lys	Lysin
Lys-PLG	Lys-Plasminogen
MLKL	mixed lineage kinase domain-like
NaCl	Natriumchlorid
NET	neutrophil extracellular trap
NLRP3	nukleotidbindenden Domäne (NOD)- ähnlichen Rezeptor Protein 3
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OP	Operation
PAD4	Protein arginine deiminase 4
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PLG	Plasminogen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SEM	Standartfehler
SPF	spezifiziert pathogenfrei
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase-type plasminogen activator

2. Einleitung

2.1 Die akute Nierenschädigung

Die akute Nierenschädigung (ANS) stellt ein heterogenes, weitverbreitetes Krankheitsbild dar, das typischerweise durch einen rapiden Untergang der exkretorischen Nierenfunktion definiert wird (1,2). Unter dem Begriff der ANS fallen diverse Krankheitsbilder, bei denen ein progredienter Nierenfunktionsabfall mit irreversiblen Nierenzell- und Nephronverlust assoziiert ist, was zum Übergang in ein chronisches Nierenversagen führen kann (2). Als typische diagnostische Merkmale der ANS wurden ein erhöhter Serumkreatininwert und eine verminderte Urinproduktion identifiziert. In dem Begriff der ANS wird der Zeitraum der ersten 7 Tage nach dem auslösenden Ereignis miteingeschlossen (1,2). Im Gegensatz umfasst der Begriff des chronischen Nierenversagens den Krankheitsverlauf ab 90 Tagen. Für den überbrückenden Zeitraum zwischen 7 und 90 Tagen wurde dementsprechend der Begriff der Akuten Nierenkrankheit eingeführt (1,2). Laut der KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) Einteilung werden bei ANS drei Stadien unterschieden (**Tab.1**), die jeweils nach Urinausscheidung und Serumkreatininspiegel definiert werden (3).

Tabelle 1: Klassifikation von ANS-Stadien nach KDIGO

Stadium	Serum Kreatininwert	Urinausscheidung
I	150-190% vom Baselinewert <i>Oder</i> ≥0,3 mg/dL (>26,5 µmol/L) Erhöhung innerhalb von 48 h	<0,5 mL/kg/h für 6-12 h
II	200-290% vom Baselinewert	<0,5 mL/kg/h für ≥ 12 h
III	300% vom Baselinewert <i>Oder</i> Erhöhung vom Serumkreatinin bis ≥4,0 mg/dL (353,6 µmol/L) <i>Oder</i> In Patienten unter 18 Jahre, Abfall eGFR bis <35 mL/min pro 1,73 m ²	<0,3 mL/kg/h für ≥ 24 h <i>Oder</i> Anurie für ≥ 12 h

Die ANS ist eine häufige Komplikation unter hospitalisierten Patienten (10-15%) (4). Unter schwerkranken Patienten, sowie unter Patienten auf Intensivstationen kann die Prävalenz dieser Erkrankung über 50% betragen (5). Ca. 10% der hospitalisierten Patienten benötigen im Erkrankungsverlauf eine Nierenersatztherapie, wobei in diesem Schweregrad der ANS mit einer Patientenmortalität von ca. 50% gerechnet wird (6). Weltweit sind ca. 13,3 Mio. Patienten von ANS betroffen, wobei dies in ca. 1,7 Mio. jährlichen Todesfällen resultiert (7). Dies setzt Gesundheitssysteme weltweit aufgrund von längeren Krankenhausaufenthalten und höheren Behandlungskosten unter Druck (8).

Die ANS ist ein Syndrom, das mehrere verschiedene Ursachen haben kann (**Abb.1**). Bezogen auf die Niere werden prärenale, intrarenale und postrenale Ursachen unterschieden (2). ANS kann insbesondere bei multimorbiden Patienten oder Intensivstationpatienten durch mehrere Ursachen gleichzeitig bedingt sein. Die prärenale Genese der ANS kommt meistens durch eine renale Hypoperfusion zustande, die beispielsweise durch Hypovolämie (bei z.B. hämorrhagischem Schock oder einer Exikose), kardialbedingte Zirkulationsstörung oder medikamentösbedingte Vasokonstriktion der afferenten Gefäße verursacht werden kann (2). Insbesondere schwerwiegende Herzerkrankungen, herzchirurgische Interventionen und Sepsis können zur Risikoerhöhung für die Entwicklung einer prärenalen ANS beitragen (9,10). Die postrenale ANS wird typischerweise durch eine Obstruktion der Harnabflusswege bedingt. Dies führt dementsprechend zu einer retrograden Harnstauung (1). Die kausale Therapie der postrenalen ANS besteht grundsätzlich nach Diagnosestellung in der Behebung der Obstruktion. Die intrarenale Nierenschädigung wird je nach betroffener Struktur als eine tubuläre, interstitielle, glomeruläre oder vaskuläre Schädigung definiert (11). Die häufigste Ursache der intrarenalen ANS in hospitalisierten Patienten ist die akute Tubulusnekrose. Die akute Tubulusnekrose wird meistens durch eine renale Ischämie, Sepsis oder Nephrotoxine verursacht (11). Endogen freigesetzte (wie z.B. Hämoglobin oder Myoglobin) oder exogen applizierte Stoffe (wie z.B. Medikamente oder Röntgenkontrastmittel) können ebenso durch verschiedene Mechanismen tubuläre Schäden hervorrufen (11,12).

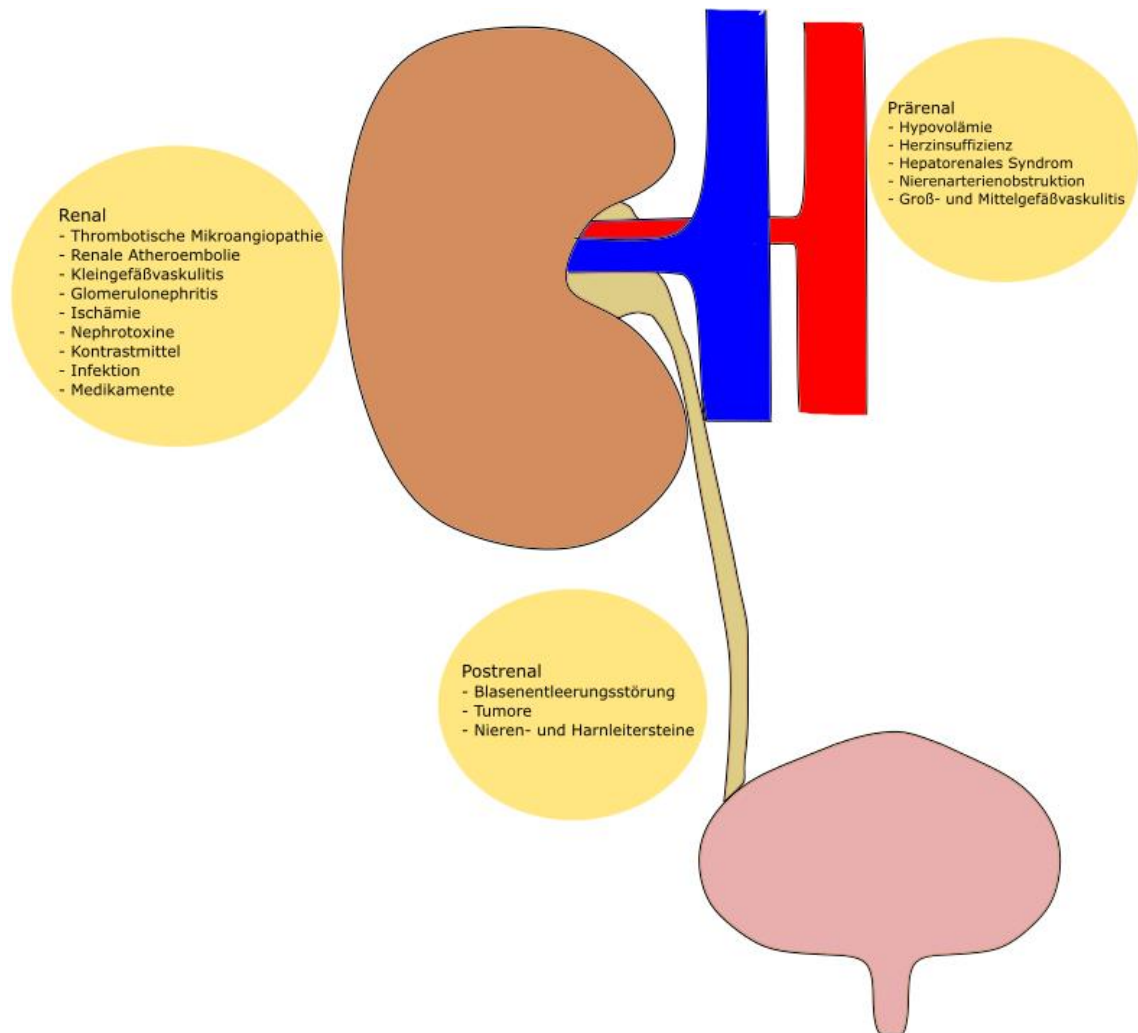


Abbildung 1: Ursachen der Akuten Nierenschädigung. Die Pathogenese und der Erkrankungsverlauf von ANS können durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Anzahl von potenziellen Auslösern erschwert die Diagnosefeststellung und die Einschätzung des Schweregrades.

Trotz der hohen Prävalenz und schlechten Prognose verbleibt die Behandlung von ANS immer noch ohne definitiv etablierte pharmakologische oder interventionelle therapeutische Strategien (13). Im klinischen Setting besteht die Therapie meistens in der Beseitigung des Auslösers (wie z.B. durch Absetzen von nephrotoxischen Medikamenten oder Behandlung der Infektion) und supportiven Maßnahmen, wie z.B. die Unterstützung der renalen Durchblutung mittels Volumen- und Flüssigkeitszugabe. Engmaschige Kontrollen des Wasser-Elektrolyt-Haushalts und Blutzuckerspiegels sind in der Behandlung von ANS genauso wichtig (2). Bei erfolglosen supportiven Maßnahmen kann zusätzlich die Nierenersatztherapie in Erwägung gezogen werden (14,15).

Allerdings gibt es für diese therapeutische Option bisher keine etablierten Einsatzkriterien. Die Entscheidung zur Nierenersatztherapie wird mit Anbetracht auf andere Faktoren wie den Kaliumspiegel, Flüssigkeitsstatus, Base-Säure-Haushalt, Kreatinin- und Harnstoffspiegel, den Gesamtverlauf der Erkrankung, sowie Nebendiagnosen getroffen (16). Die KDIGO Leitlinien betonen die Bedeutung der richtigen Stadiumerkennung zum optimalen Verlauf der ANS-Therapie, jedoch beinhalten die Leitlinien zurzeit keine spezifische Empfehlung zur medikamentösen Therapie (17).

Der klinische Verlauf von ANS verbleibt häufig stumm. In gesunden Patienten lässt sich eine Erhöhung vom Serumkreatininspiegel erst ab einem 50% GFR-Abfall nachweisen. Dies spricht für eine niedrigere Sensitivität vom Kreatinin als Serummarker insbesondere im Anfangsstadium von ANS (18). Die ausgeschiedene Urinmenge wird zur Beurteilung der Nierenfunktion miteinbezogen, jedoch wird sie außerhalb von Intensivstationen seltener bestimmt. Zudem kann eine Schädigung der Nierentubuli in einer Polyurie resultieren (19). Obwohl Änderungen in der Urinausscheidung oder Abweichungen im Serumkreatininwert weder sensitiv, noch spezifisch genug sind, bleiben sie heutzutage bei der Diagnostizierung von ANS unerlässlich (20). Unter Laborbedingungen lässt sich die GFR genauer bestimmen, der Prozess bleibt aber mit der heutzutage verfügbaren Technologie zeitaufwendig. Die Diagnostizierung von ANS kann noch dadurch Schwierigkeiten bereiten, indem das ANS-Syndrom gleichzeitig mehrere Ursachen haben kann. (1,2,6).

Unter den vielen möglichen Ursachen von ANS zählt auch der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) (21). Der IRS beinhaltet die initiale Unterbrechung der Nierenperfusion und die darauffolgende Reperfusion. Der IRS findet typischerweise als Folge von chirurgischen Eingriffen, Nierentransplantationen, septischem Schock oder Trauma statt (21,22). Während der Reperfusion vom Gewebe, das zuvor einem Sauerstoffmangel ausgesetzt war, kann es zur Störung des Gleichgewichts im Gewebemetabolismus kommen, wodurch zelluläre Schäden entstehen. Von betroffenen Nierenzellen werden im Anschluss toxische Substanzen (u.a.

proinflammatorische Zytokine) freigesetzt, welche weitere Schäden an den epithelialen und endothelialen Nachbarzellen anrichten können, was im Endeffekt zu Nekrosen und zum Nierenfunktionsverlust führen kann (23). Grundsätzlich kann eine Vielzahl an pathophysiologischen Mechanismen, wie z.B. die Nekrose von Tubulusepithelzellen, aber auch inflammatorische Prozesse, zur Entstehung und Progression von ischämischer ANS beitragen.

Der renale Blutfluss ist für die regelrechte Nierenfunktion unerlässlich. Eine renale Perfusionsminderung spielt durch ihren negativen Effekt auf die GFR eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von ANS in schwerkranken Patienten (24). Mikrozirkulatorische Perfusionsstörungen scheinen hierbei eine übergeordnete Rolle im Vergleich zur globalen Blutflussminderung zu haben (24). Die Gefäße der renalen Mikrovaskulatur bestehen aus zwei Komponenten, nämlich den glomerulären Kapillaren und dem peritubulären Kapillarnetz. Eine mikrozirkulatorische Oxygenierungsstörung kann die Progression von ANS begünstigen (24). Dadurch lässt sich vermuten, dass zeitgerechte Maßnahmen für den Erhalt des mikrovaskulären Blutflusses den Übergang von ANS zum Nierenversagen vom Vorteil sein können (25). Diese Maßnahmen sollten an die spezifische Ursache der Mikrozirkulationsstörung gerichtet werden. Eine typische Ursache für eine solche Mikrozirkulationsstörung findet man in dem Cholesterinkristallemboliesyndrom.

2.2 Cholesterinkristallembolie

Die Cholesterinkristallembolie (CCE) („*atheroembolic disease*“) ist eine Erkrankung, die typischerweise als Folge von fortgeschrittener Atherosklerose zustandekommt (26). Sie gilt häufig als eine klinisch unterdiagnostizierte Erkrankung (27-29). Die CCE wird typischerweise durch die Freisetzung von Cholesterinkristallen (CC) aus atheromatösen Plaques in den Blutkreislauf hervorgerufen, die im Anschluss in periphere Gefäße gelangen und dort an mehreren Stellen Obstruktionen verursachen können (26,30). Die Obstruktionen können dann zu ischämischen und inflammatorischen Schäden in verschiedenen Organen führen (26,31). Wenn die Nieren dadurch betroffen sind,

werden häufig die Bezeichnungen „*atheroembolic renal disease*“ oder „*cholesterol atheroembolic renal disease*“ verwendet (31,32).

Die Inzidenz der CCE wird klinisch zwischen 0,09% und 2,9% geschätzt (33-35). Die durch Autopsien bestätigte allgemeine Inzidenz beträgt zwischen 0,31% und 2,4% (36,37), jedoch unter Einbezug des Alters oder durchgeführten medizinischen Interventionen (wie z.B. Aortographien oder allgemeine Eingriffe an der Aorta) steigt die geschätzte Inzidenz auf 12-77% (38,39). Die CCE wird in vielen Fällen auch leicht übersehen und es lässt sich vermuten, dass die tatsächliche Inzidenz der Erkrankung höher ist als die Zahlen, die durch bestätigte klinische Fälle übermittelt werden (31).

Im Gegensatz zu arteriellen Thromboembolien, bei denen nach abgeschlossener Thrombusbildung und anschließender Dislokation meistens nur ein Gefäßast betroffen ist, können bei der CCE abhängig von Kristallmenge und Lokalisation mehrere Gefäße und Organe gleichzeitig betroffen sein (40). Dieser Prozess kann sich aufgrund von erneuter Freisetzung und Reembolisierung von CC auch mehrfach wiederholen (40). Aus diesem Grund können sich CCE-Patienten je nach betroffenem Organ oder Organsystem mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik vorstellen (**Abb.2**) (36,38). Plaqueruptur in der *Aorta descendens* oder *Aorta abdominalis* kann in der Regel zur Embolusverschleppung in die Bein-, Viszeral- oder Nierenarterien führen (41-44). Ein Embolusursprungsort in der *A. carotis* kann zu neurologischen Ausfällen oder Augenbeteiligung führen (**Abb.2**) (45-48). Unter den selteneren Manifestationsorganen zählen die Muskeln, die Milz, das Herz und die Lunge (49-52). Im Allgemein lässt sich vermuten, dass praktisch jedes Organsystem durch CCE betroffen sein kann (52). Zuletzt können im Erkrankungsverlauf unspezifische Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust, Myalgie und Kopfschmerzen auftreten (44,53-56).

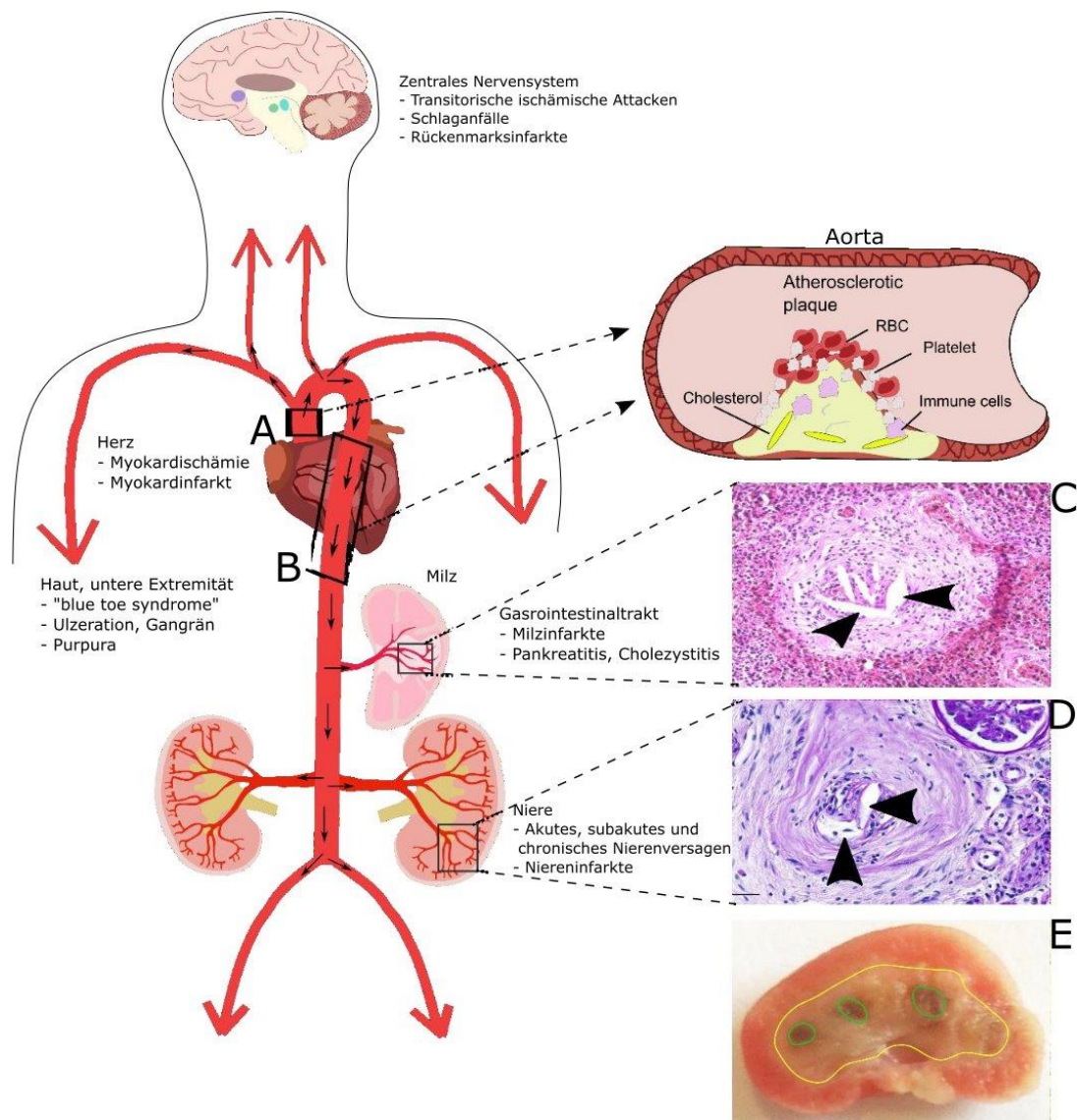


Abbildung 2: Folgen der Cholesterinkristallembolie. A: Eine Ruptur der atheromatösen Plaque in der *Aorta ascendens* führt zur Zerstreung von Cholesterinkristallen in die Extremitäten und die Karotiden. In den Extremitäten führt dies zur typischen Verfärbung der Zehen, das sogenannte „blue toe syndrome“. Eine Obstruktion der Karotiden kann zu transitorischen ischämischen Attacken oder Schlaganfall führen. B: Kristallfreisetzung aus Plaques in der *Aorta descendens* kann CCE in verschiedenen Organen hervorrufen, unter anderem in der Niere, im Gastrointestinaltrakt und in den unteren Extremitäten. C: Abbildung von CCE in der Milz, die Pfeile zeigen die „cholesterol clefts“, die von Cholesterinkristallen hinterlassen wurden. D: CCE in der Niere. Die Pfeile zeigen „cholesterol clefts“. Neben der obstruierten Arterie findet man nekrotische Tubuluszellen. E: Ein durch CCE verursachter Niereninfarkt in einer murinen Niere. Die grünen Kreise umgeben die nekrotischen Kerne, in gelb umschlossen ist das gesamte infarzierte Nierenareal. Modifiziert nach Shi (57).

2.2.1 Pathogenese der Cholesterinkristallembolie

Atherosklerotische Plaqueformation Der erste Schritt in der Abfolge von pathophysiologischen Prozessen, die an der Pathogenese von CCE beteiligt sind, ist die Bildung von atheromatösen Plaques an der arteriellen Gefäßwand (43). Dieser Prozess, auch allgemein als „Atherosklerose“ bekannt, zeichnet sich durch die Einlagerung von verschiedenen Zellen, Lipiden und Zelldetritus in die Gefäßintima aus (58,59). Die Atherosklerose hat eine hohe Prävalenz unter Patienten im fortgeschrittenen Alter (>60 J.), was Alter auch zum Risikofaktor für die Entwicklung von CCE macht (53). Andere Risikofaktoren, die die Plaquebildung begünstigen, sind Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes Mellitus, Rauchen und männliches Geschlecht (53).

Die Struktur der atheromatösen Plaque zeichnet sich durch eine fibröse Deckplatte aus, die einen nekrotischen Kern umschließt. In diesem Kern befinden sich Cholesterinkristalle, nekrotischer Zelldetritus und Schaumzellen (60). Eine Ausdünnung der fibrösen Deckplatte kann hierbei zur strukturellen Instabilität der Plaque führen. Dadurch entsteht die Gefahr, dass der Inhalt des nekrotischen Kerns, unter anderem auch die Cholesterinkristalle, in den Blutkreislauf gelangt (41,44). Die Plaquebildung in der distalen Aorta ist im Vergleich zur proximalen Aorta stärker ausgeprägt, was die *Aorta abdominalis* und *A. iliofemoralis* zu den typischen CCE-Ursprungslokalisationen macht (61).

Plaqueruptur Die Plaqueruptur hat eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie von CCE. Aufgrund von einer iatrogenen oder spontanen Störung der Plaqueintegrität werden die Cholesterinkristalle in den Blutkreislauf disloziert, wo sie anschließend embolisieren (53). Allgemeine Faktoren, die zur Erhöhung der Plaqueinstabilität führen, sind hämodynamischer Stress, Entzündung oder Blutung (60). Diese Faktoren können eine Plaquerosion und letztlich eine spontane Plaqueruptur hervorrufen (53). Heutzutage wird den meisten Fällen von CCE eine iatrogene Ursache zugeschrieben (53). Die Plaqueintegrität kann insbesondere durch medizinische Eingriffe gefährdet werden, die ein hohes Risiko für Gefäßwandläsionen tragen. Darunter zählen Herzkatheteruntersuchungen und Angiographien (62-64), gefäßchirurgische

Operationen (42,65), sowie perkutane Eingriffe an der *A. carotis* (66-68).

Eine Korrelation zwischen CCE und Antikoagulantien- oder Thrombolykatherapie ist heutzutage noch umstritten (53,69). Als Ursache für ein durch Antikoagulantien- und Thrombolytikumgabe erhöhtes CCE-Risiko werden meist Mikrohämmorrhagien vermutet, die die atheromatösen Plaques destabilisieren können (69,70). In einer Studienreihe von Patienten mit biopsiesicherter CCE wurde eine antikoagulatorische Therapie als CCE-Hauptursache in 13-76% der Fälle vermutet (53). Allerdings kann diese hohe Zahl auch auf schon durchgeführte kardiovaskuläre Eingriffe zurückgeführt werden, da eine antikoagulatorische Therapie allein als Triggerfaktor nur bei 7% der Patienten bestimmt wurde (31,53).

Embolisierung vom Plaqueinhalt und Folgen Nach der Öffnung der fibrösen Deckplatte gelangen die Inhalte des nekrotischen Kerns in den Blutkreislauf. Diese Kernbestandteile embolisieren und werden nach peripheren Gefäßen verschleppt (53). Im Unterschied zu typischen arteriellen Thromboembolien können Cholesterinkristalle repetitiv aus dem nekrotischen Kern freigesetzt werden und somit rekurrente Thrombosen verursachen. Als Folge der CC-Freisetzung aus dem nekrotischen Kern entstehen sogenannte „*cholesterol crystal showers*“, die Mikrothrombi bilden können (71). Diese Mikrothrombi verursachen dann Obstruktionen in Arteriolen mit Durchmesser von 100-200 μm (72). In Biopsien zeigen sich die Obstruktionen typischerweise als nadelförmige oder ovale Lücken, die nach dem Abwaschen von CC während der histologischen Aufbereitung der Biopsieproben bestehen bleiben, oder die auch „*cholesterol crystal clefts*“ genannt (73). Die Lücken sind meist vom thrombotischen Material umgeben (53).

Die durch Mikrothrombosen verursachten mechanischen Obstruktionen führen letztlich zur Ischämie und einer entzündlichen Reaktion, was in Endorganschäden resultieren kann. Je nach betroffenem Organ sind die Auswirkungen vom Endorganschäden unterschiedlich, in der Niere lässt sich meist eine Abnahme der Nierenfunktion mit begleitendem klinischem Bild einer ANS beobachten (30).

2.2.2 Renale Cholesterinkristallembolie

Die Niere zählt zu den Organen, die durch CCE besonders gefährdet sind. Eine Nierenbeteiligung wurde mittels Autopsien in 74% der histopathologisch bestätigten CCE-Fälle festgestellt (74). Dieser hohe Prozentsatz lässt sich vermutlich auf die Nähe der Nieren zur abdominalen Aorta hinführen (74). CCE in der Niere kann auch einen klinisch unauffälligen Verlauf haben, wobei laut Studien nur bei 20-30% von durch CCE betroffenen Patienten eine beeinträchtigte Nierenfunktion bestimmt werden konnte (75-77). Die typische Begleitsymptomatik zeigt sich durch erhöhte Serumkreatininwerte, eine Proteinurie und eine schwer kontrollierbare Hypertonie (78). Der klinische Erkrankungsverlauf ist variabel. Grundsätzlich ist mit einer akuten, subakuten oder chronischen Beeinträchtigung der Nierenfunktion zu rechnen (53). Bei 28-61% der Patienten mit akutem oder subakutem Verlauf wird eine Dialyse benötigt. In 20-30% der Fälle wird eine partielle Wiederherstellung der Nierenfunktion nach zeitlich begrenzter Dialyse-Unterstützung beobachtet (54-56,79,80). Jedoch werden ca. ein Drittel der Patienten im Verlauf mit terminaler Niereninsuffizienz diagnostiziert (80). Ein besonders hohes Risiko für einen Übergang in eine terminale Niereninsuffizienz oder tödlichen Erkrankungsverlauf zeigt sich bei Patienten mit vorbestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren oder renaler Funktionsminderung (74).

Pathophysiologie der Cholesterinkristallembolie in der Niere

Durch die Freisetzung von CC bilden sich Thrombosen typischerweise in den arkuaten und interlobaren Gefäßen, ein Teil der CC gelangen aber auch in die afferenten Arteriolen und glomerulären Kapillaren (81). Es lässt sich vermuten, dass die Abnahme der Nierenfunktion aufgrund von Unterbrechung der glomerulären Perfusion zustande kommt. Laut *Shi C, et al.* sind nicht die Cholesterinkristalle an sich, sondern die „biologische Matrix“, die sich um die CC bildet, für die Gefäßobstruktionen verantwortlich (80). Diese Matrix besteht aus Thrombozyten, Neutrophilen, Fibrin und extrazellulärer DNA (**Abb.3**) (82). Mittels eines Mausmodells der CCE konnte hierbei eine negative Korrelation zwischen der Menge von CC, die in die Nierenarterie injiziert wurde, und der gemessenen Nierenfunktion etabliert werden (82). Dies lässt sich

vermutlich durch die höhere Zahl an Gefäßobstruktionen erklären. Die makroskopische Analyse der Niere ergab Gewebedefekte, Nierenschwellung und territoriale Niereninfarkte (82). Dabei war jedoch die Korrelation mit der CC-Menge weniger eindeutig als bei der Bestimmung der Nierenfunktion. Die Induktion von CCE in diesem Mausmodell resultierte unter anderem in Nekrose, interstitielle Ödeme, Neutrophileninfiltrate und Verlust von Mikrovaskulatur der betroffenen Niere (82). Es lässt sich dadurch vermuten, dass Nierenendorganschaden sowohl durch die mechanischen Gefäßobstruktionen, als auch durch die lokalen Entzündungsprozesse hervorgerufen wird.

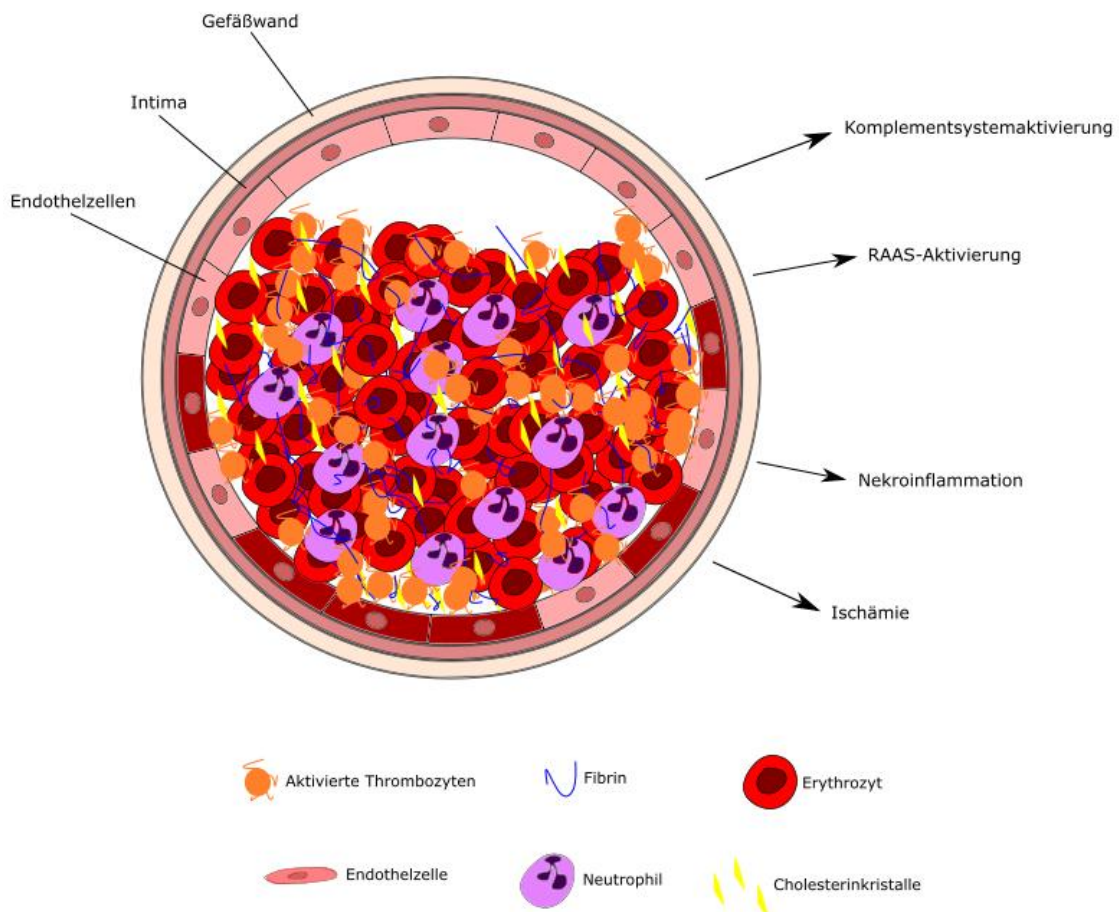


Abbildung 3: Intraluminaler Cholesterinkristallthrombusbildung. Obstruktion einer Arterie durch den Cholesterinkristallthrombus und seine Bestandteile. Die Cholesterinkristalle an sich machen einen nur geringen Anteil der Thrombuszusammensetzung aus. Die biologische Matrix, die sich um die Cholesterinkristalle bildet, verursacht die daraus resultierenden Gefäßverschlüsse und Gewebeischämie. Im Anschluss entstehen durch die zusätzliche Aktivierung von mehreren pathologischen Mechanismen weitere Nierenschäden, die letztlich zum akuten Nierenversagen führen können.

Cholesterinkristalle sind grundsätzlich in der Lage, eine entzündliche Reaktion zu provozieren. Dies geschieht durch ein Zusammenspiel von Gewebeischämie und Zellnekrose, auch als „Nekroinflammation“ bekannt (83). Die lokale inflammatorische Reaktion beginnt relativ früh, wobei Leukozyten, mononukleäre Zellen und Riesenzellen innerhalb von 24 h am Ort der Läsion vorkommen (84). Diese Immunzellen versuchen dann die CC zu phagozytieren. Weil das in der Regel nicht möglich ist, können die CC-Partikel für eine scheinbar unbegrenzte Zeit im Gefäßlumen persistieren (53). Innerhalb der ersten Woche lassen sich Endothelzellproliferation und Intimafibrose feststellen (84). Dadurch werden die CC langsam komplett umschlossen, was zur Einengung vom Gefäßlumen und renaler Ischämie führen kann (84). Die Gewebeischämie wird bei Patienten als die Hauptursache für Nierenatrophie und interstitielle Fibrose angenommen (85).

Endothelzellschäden können sowohl durch den direkten Kontakt mit den CC, als auch durch die Aktivierung des Komplementsystems entstehen (81,86). *Martinon F, et al.* konnten in ihrer Studie veranschaulichen, wie CC die Aktivierung vom Interleukin-1 β in mononukleären Phagozyten mittels des nukleotidbindenden Domäne (NOD)-ähnlichen Rezeptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasoms vermitteln (30,87). Dieses Inflammasom bewirkt so die Aktivierung von Caspase-1 und die Sekretion von Interleukin-1 β (30). CC sind zudem in der Lage, Zellnekrose durch die NLRP3-getriggerte Sekretion von Interleukin-1 α/β aus Makrophagen zu provozieren (88,89). Direkte CC-Bindung am „*human macrophage-inducible C-type lectin (hMincle)*“ kann die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen bewirken (90). CC sind dazu fähig, sowohl den klassischen, als auch den alternativen Weg des Komplementsystems zu aktivieren (91,92). Unter den aktivierbaren Komplementfaktoren zählen C5a, der Leukozytenaggregation und Endothelzellschäden bewirkt (93), sowie die C5b-9 und C3c Faktoren (92). CC-vermittelte Komplementfaktoraktivierung zeigt sich hierbei als ein wichtiger Kontrollmechanismus bei der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (74).

Der arterielle Blutdruck ist bei Patienten mit CCE oft schwer einzustellen. Dies könnte durch die CCE-vermittelte Aktivierung vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bedingt sein (74,94). Die Obstruktion von arkuaten und interlobaren Arterien, afferenten Arteriolen oder glomerulären Kapillaren durch CC-Thrombosen führt zur lokalen Perfusionsminderung und somit zur Aktivierung vom RAAS, was noch aufgrund vom oxidativen Stress zur Apoptose, Inflammation und Fibrose führen kann (74,95). Eine RAAS-Aktivierung kann aufgrund von Gefäß- und Gewebeumbauprozessen den Übergang in die chronische Niereninsuffizienz fördern. Dies könnte potenziell für einen Einsatz von RAAS-Inhibitoren in der CCE-Therapie sprechen (74).

2.3 Therapie der Cholesterinkristallembolie

2.3.1 Experimentelle *in vivo* Therapiemethoden

Das Fehlen von einem geeigneten *in vivo* Modell der CCE in der Niere hat bis vor Kurzem die Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien und Medikamenten für diese Erkrankung erschwert. Mittels eines von *Shi et al.* neu entwickelten Tiermodells der CCE konnten in einer früheren Studie mehrere potenziell in der CCE-Therapie einsetzbare Medikamente untersucht werden (82). Anhand von diesem Tiermodell wurden Cholesterinkristallthromben „*crystal clots*“ als therapeutisches Ziel etabliert. Die CC-Thromben, die sich um den injizierten CC im Zeitverlauf bildeten, bestanden vorwiegend aus Fibrin, Thrombozyten, extrazellulärer DNA und Neutrophilen, wobei die Kristalle an sich nur einen geringen Teil vom Thrombus ausmachten (**Abb.3**) (82). Gerade diese CC-Thromben wurden als die Hauptursache für die Gefäßobstruktionen festgesetzt. 24 h nach CC-Injektion in die linke Nierenarterie wurde in diesem Mausmodell ein dosisabhängiger GFR-Abfall bestimmt. Gleichzeitig ließen sich an der betroffenen Niere mikroskopisch eine kortikomedulläre Nekrose, interstitielles Ödem, Neutrophileninfiltraten und CD31+ Mikrovaskulaturverlust nachweisen. 14 Tage nach dem Eingriff erfolgte eine komplette Erholung der Nierenfunktion und Reduktion der Infarktgröße (82). Es ließ sich daraus dementsprechend ableiten, dass die Injektion von CC dosisabhängig arterielle Obstruktionen und somit territoriale Infarkte, periläsionäre

Inflammation und Organversagen verursacht (82). Dank der näheren Erläuterung der pathophysiologischen Mechanismen der CCE in der Niere, sowie der Zusammensetzung von CC-Thromben, ließen sich mehrere Angriffspunkte für potenzielle therapeutische Strategien explorieren.

Nekroptoseinhibitoren Die „*mixed lineage kinase domain-like*“ (MLKL)-abhängige Nekroptose und „*NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3*“ (NLRP3) Inflammasom-abhängige sterile Inflammation tragen zur Tubulusnekrose und Nierenfunktionsverlust nach vorübergehendem arteriellem Verschluss bei (96-99). MLKL-defiziente Mäuse, die mit dem Nekroptosis Inhibitor Nekrostatin (Nec)-1s oder mit dem NLRP3 Inhibitor MCC950 vorbehandelt wurden, zeigten Reduktion der Niereninfarktgröße, der Nierenschäden und der Neutrophileninfiltration 24 h nach der CC-Injektion (82). Jedoch konnte dabei kein Schutz vor Nierenfunktionsverlust erreicht werden. Dies lässt sich auf die Bedeutung der glomerulären Perfusion für die Nierenfunktion zurückführen. Eine nur an die Nekrose und Nekroinflammation gerichtete Behandlungsstrategie konnte die Gefäßobstruktionen nicht beheben und somit eine ANS nicht vorbeugen.

Neutrophilantagonisierung Durch die Freisetzung von „*neutrophil extracellular traps*“ (NETs) tragen Neutrophile im Zusammenspiel mit Trombozyten zur arteriellen Thrombose bei (100-102). Neutrophile scheinen auch einen Teil von der biologischen Matrix der CC-Thromben zu bilden, wobei NETs nur geringfügig nachgewiesen werden konnten (82). Die Depletion von Neutrophilen vor der CC-Injektion bewirkte im Mausmodell eine komplette Rückbildung der periläsionären Neutrophileninfiltraten und eine signifikante Infarktgrößenreduktion, ohne einen Effekt auf die Gefäßobstruktionen oder GFR zu zeigen (82). Eine Ausschaltung der PAD4-abhängiger NET-Freisetzung mittels Cl-Amidin zeigte ähnliche Ergebnisse (82).

Thrombozytenaggregationshemmer Thrombozytenaggregationshemmer werden typischerweise klinisch in der Prävention von thrombotischen Ereignissen eingesetzt (103). Im Gegensatz zu der Neutrophilantagonisierung erreichte im Tiermodell die Therapie mittels des P2Y2-Rezeptorantagonists Clopidogrel einen Schutz vor

Gefäßobstruktionen, GFR-Abfall, Niereninfarkten und periläsionären Neutrophileninfiltraten (82). Daraus lässt sich rückschließen, dass Thrombozyten eine übergeordnete Rolle in der Bildung von CC-Thrombosen im Vergleich zu Neutrophilen spielen. Dies macht sie dementsprechend zum geeigneten Therapieziel in der Vorbeugung von CCE-assoziierten Gefäßobstruktionen, Organversagen und Gewebeinfarkten.

Antikoagulantien und Fibrinolytika Das Fibrinnetz ist schon klinisch als Angriffspunkt in der Therapie von arteriellen und venösen Thrombosen etabliert (104). Da das Fibrinnetz auch ein Bestandteil von CC-Thromben ist, können Antikoagulantien und Fibrinolytika eventuell auch hier eingesetzt werden. Mittels Heparin und Urokinase ließ sich im Mausmodell die Zahl an Gefäßobstruktionen verringern, wodurch sich GFR-Abfall, Nierenschäden, Neutrophileninfiltration und Gefäßschäden vorbeugen ließen (83). Anhand von diesen Ergebnissen lässt sich die Bedeutung der CC-Thromben für die Entstehung von CCE-assoziierten Komplikationen veranschaulichen.

DNase I-Therapie Die extrazelluläre DNA nimmt an der Zusammensetzung von CC-Thromben, sowie von üblichen arteriellen und venösen Thrombosen, teil (82,101,105). Sie wird meist unter dem Einfluss von CC und Thrombozyten von Neutrophilen und Endothelzellen freigesetzt und trägt somit zur Thrombusbildung und Gefäßobstruktionen bei (82). Die DNase I-Behandlung zeigte sich im Mausmodell als mögliche Therapieoption für die Vorbeugung von CC-induzierter Thrombozytenaggregation, Thrombozytenaktivierung und Fibrinbildung (82).

Anhand des von *Shi C, et al.* entwickelten Mausmodells wurde die Bedeutung der CC-Thromben in der Pathophysiologie von CCE demonstriert. Die Auflösung der biologischen Matrix, die sich um die CC bildet, ist von besonderer Bedeutung für die Prävention von CCE-assoziierten Gefäßobstruktionen und Nierenfunktionsverlust gewesen (82). Jedoch bleibt heutzutage der Einsatz von Antikoagulantien und Fibrinolytika in der klinischen Therapie von CCE aufgrund von möglicher Plaquestabilisierung und rezidivierender CC-Freisetzung umstritten (53). Zudem werden die meisten Fälle von CCE iatrogen verursacht (z.B. nach Eingriffen an der Aorta)

(73), wobei gerinnungshemmende Medikamente wegen diesen Interventionen typischerweise abgesetzt werden müssen. Die DNase I-Behandlung lieferte positive Ergebnisse, allerdings konnte ein kompletter Schutz nur in Kombination mit einem Nekroptosisinhibitor erzielt werden (82). Nichtsdestotrotz lassen sich anhand von diesem Mausmodell der CCE weitere therapeutische Strategien zuverlässig explorieren.

2.3.2 Klinische Behandlungsmethoden

In der Therapie von CCE wurde bisher keine definitive Behandlungsstrategie etabliert. Die Behandlung von CCE hat primär als Ziel, sekundäre Ischämiefolgen und Reembolisierungen vorzubeugen (53).

Prävention CCE entsteht typischerweise als Folge von fortgeschrittener Atherosklerose. Als solche ist die kardiovaskuläre Prävention ein Baustein in der Prävention von CCE (106). Dies beinhaltet je nach Risikoeinschätzung Aspirin- und Statineinnahme, Rauchverzicht, Blutzucker- und Blutdruckeinstellung, sowie Körpergewichtskontrolle (106). Zur Prävention zählt zudem die Vermeidung von Faktoren, die unmittelbar zur Auslösung von CCE beitragen können, insbesondere bei Patienten mit vorbestehendem hohem Risiko. Invasive kardiovaskuläre Interventionen stellen immer ein besonderes Risiko dar und sind bei Hochrisikopatienten nur in Ausnahmefällen durchzuführen bzw. womöglich durch nicht-invasive Methoden zu ersetzen (74). Obwohl bisher keine definitive Korrelation zwischen Antikoagulantien-/Fibrinolytikagabe und CCE etabliert wurde, sollten diese Medikamente nur unter Risikoabwägung (z.B. in Patientin mit Vorhofflimmern oder künstlichen Herzklappen) und strenger Kontrolle eingesetzt werden (26).

Statine Die Rolle von Statinen in der kardiovaskulären Prävention ist schon lange etabliert. Es lässt sich vermuten, dass sie aufgrund von ihren lipidsenkenden und antiinflammatorischen Eigenschaften auch einen positiven Effekt in der Behandlung von CCE haben können (80,107). Aufgrund von diesen Eigenschaften wird den Statinen eine plaquestabilisierende Wirkung zugeschrieben (53). Statine schienen in einzelnen Studien eine renoprotektive Wirkung aufzuweisen (108,109). In einer Studie von *Scolari*

F, et al. war Statinbehandlung in CCE-Patienten mit erniedrigtem Risiko für einen Übergang in eine terminale Niereninsuffizienz, sowie mit verbesserter 1-Jahr Lebenserwartung assoziiert (80). Allerdings bleibt eine definitive Bestätigung anhand von großen randomisierten Studien zurzeit noch aus.

Kortikosteroide Kortikosteroide werden aufgrund von ihrer Rolle bei der Inflammation in der Pathophysiologie häufig für die Therapie von CCE in Betracht gezogen (31). Allerdings sind Ergebnisse von ihrem Einsatz aus kleinen oder Fallstudien inkonsistent. Nach Gabe von Prednisolon in 1 mg/kg/d Dosis zeigten Patienten in einer Studie im Erkrankungsverlauf eine Besserung der Nierenfunktion (110). *Belenfant et al.* berichten über klinische Besserung von 18 Patienten mit CCE-Rekurrenz nach Behandlung mit niedrig dosierten (0,3 mg/kg) Kortikosteroiden (56). Im Kontrast dazu zeigen die Ergebnisse von anderen Studien insbesondere im Langzeitverlauf keinen Vorteil der Kortikosteroidbehandlung (77,111). Auch für diese Therapieoption fehlen große randomisierte Studien, die diese Diskrepanzen adressieren können.

Interventionelle und chirurgische Behandlung Einige Studien haben darauf hingewiesen, dass chirurgische Interventionen wie Endarterektomie oder Bypass bei genauer Embolusursprungsortlokalisierung vorteilhaft sein können (35,112). Diese Lokalisierung ist jedoch nur selten möglich. *Keen et al.* berichten in ihrer Arbeit bei Patienten nach chirurgischer Behandlung über eine 89% 1-Jahr Überlebensrate (112). Eine chirurgische Intervention ist allerdings nur in einzelnen Fällen durchführbar und ist meist für lebensbedrohliche Fälle reserviert (31). Angioplastie und Stentimplantation haben in einzelnen Patienten einen positiven Effekt gezeigt (35,113). Es ist zu beachten, dass jegliche vaskuläre Interventionen ein intrinsisch erhöhtes Risiko für CCE tragen, weswegen sie nur in Ausnahmefällen durchzuführen sind (31).

Nierenersatztherapie und supportive Maßnahmen Patienten mit schwerwiegender ANS aufgrund von CCE sind grundsätzlich für eine Nierenersatztherapie zu berücksichtigen. Sowohl Peritonealdialyse, als auch Hämodialyse haben sich dabei als effektive Maßnahmen erwiesen (56). Supportive Maßnahmen sind typischerweise an eine bessere Kontrolle der assoziierten Hypertension, Herzinsuffizienz oder

Nierenversagen gerichtet (53). Zusätzlich ist eine parenterale Ernährung insbesondere in der Akutphase von schwerwiegenden Fällen in Erwägung zu ziehen (56).

Schlussfolgernd ist für CCE bisher keine definitive klinische Therapie etabliert. Dies trägt zur hohen Mortalität dieser Erkrankung bei und führt zur erheblichen Belastung des Gesundheitssystems. Die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien sollte daher in der Behandlung von CCE als Priorität gesehen werden. Der Erhalt der Nierenfunktion und die Vermeidung von Nebenwirkungen (wie z.B. Blutungskomplikationen oder Reembolisierung) sollten bei einem Therapieansatz von neuen Medikamenten beachtet werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, eine neue potenzielle therapeutische Option in der Behandlung von CCE zu explorieren, die das Bild einer ANS und begleitender Komplikationen effektiv und nebenwirkungsarm vorbeugen kann.

2.4 Plasminogen – Eigenschaften und Therapiepotenzial

2.4.1 Plasminogen – Struktur und Funktion

Als Plasminogen (PLG) bezeichnet man die inaktive Vorstufe (Proenzym) des Plasmins. Das Plasmin ist die proteolytisch aktive Form vom Plasminogen und spielt eine essenzielle Rolle in der Fibrinolyse (114). Die Aktivierung vom Plasminogen erfolgt mittels Plasminogenaktivatoren, nämlich mittels des Gewebespezifischen Plasminogenaktivators („*tissue-type plasminogen activator*“ oder tPA) und des Urokinase-Typ Plasminogenaktivators (uPA). Die Plasminogenaktivatoren werden von Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt (115). Plasminogen wird hauptsächlich in der Leber produziert, jedoch kann auch eine extrahepatische Synthese vorkommen (115,116). Plasminogen weist eine relativ stabile Konzentration im Plasma (200 µg/mL oder 2 µM) und eine Plasmahalbwertszeit von ca. 2 Tagen auf (114). Diese Konzentration kann allerdings während einer Akute-Phase-Reaktion ansteigen (117).

Plasminogen ist ein einkettiges Glykoprotein mit einer Masse von 92 kDa. Es besteht aus 791 Aminosäuren und einem zweiprozentigen Kohlenhydratanteil (115). Die Struktur

vom Plasminogen weist zudem ein N-terminales Aktivationspeptid (bestehend aus 77 Aminosäureresten), fünf Kringle-Domänen und eine Protease-Domäne auf (118). Die Kringle-Domänen sind Strukturen, die aufgrund von ihrer Affinität für Lysinreste für die hohe Bindungsspezifität vom Plasminogen sorgen (115). Diese Lysinreste befinden sich typischerweise auf Fibrin- und Zelloberflächen, was die spezifische Substratbindung vom Plasminogen ermöglicht. Nachdem Plasminogen an den exponierten Lysinresten angekoppelt wird, erfolgt eine Konformationsänderung vom Plasminogen, wodurch die Spaltungsstellen in der Struktur zu tPA und uPA exponiert werden. Dies resultiert im Endeffekt in der Konformationsänderung vom Plasminogen mithilfe von tPA und uPA ins proteolytisch aktive Plasmin (**Abb.4**) (119). Plasmin bewirkt eine Fibrinspaltung an Lysin- und Argininbindungen, wodurch intermediäre Teilfragmente entstehen, die für eine weitere proteolytische Degradation anfällig sind (120). Durch die fibrinolytische Aktivität vom Plasmin entstehen Fibrin-Abbauprodukte „*fibrin degradation products*“ (FDP), die anschließend vom Kreislauf entsorgt werden können. Wenn das nicht geschieht, können die Fibrin-Abbauprodukte persistieren und erneut zueinander oder zum Thrombus binden (121).

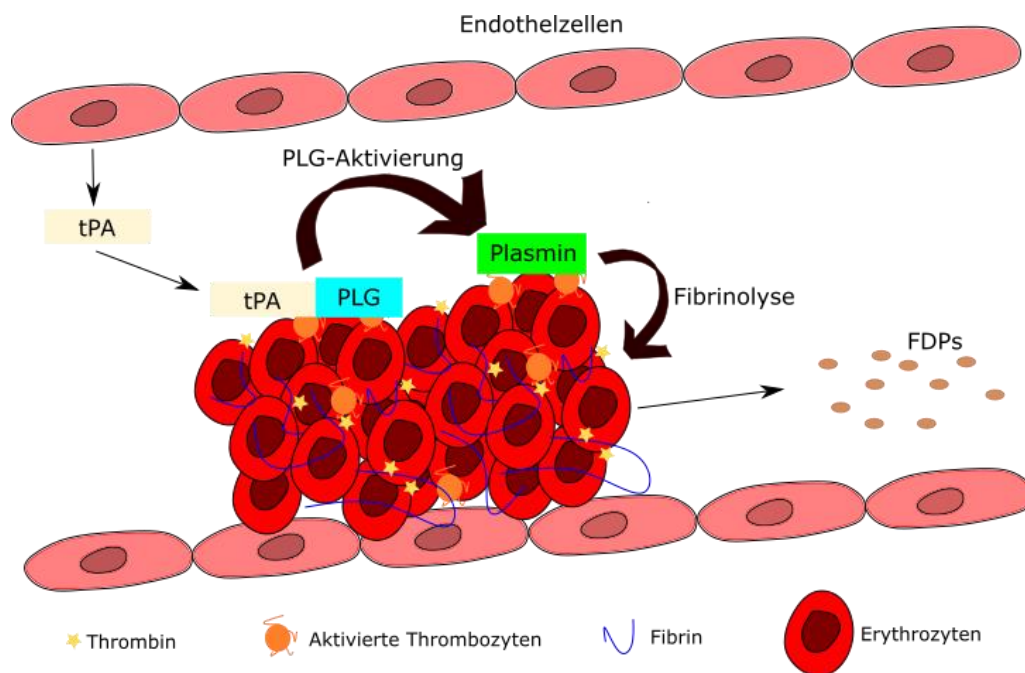


Abbildung 4: Ablauf der Fibrinolyse. tPA wird in der Regel aus Endothelzellen sezerniert. Dieser Plasminogenaktivator bindet am Plasminogen und bewirkt durch proteolytische Spaltung seine Transformation in Plasmin. Das Plasmin setzt die Thrombolyse in Gang, wodurch arterielle Thromben beseitigt werden. Das Endprodukt dieses Prozesses sind die Fibrin-Abbauprodukte (FDPs).

2.4.2 Thrombolytische Therapie und Plasminogen

Die thrombolytische Therapie hat grundsätzlich das Ziel, durch die Auflösung von arteriellen oder venösen Thromben die Rekanalisierung von Blutgefäßen oder Kathetern zu ermöglichen. Typische Thrombolytika besitzen grundsätzlich die Eigenschaft, Plasminogen in seine aktive Form, nämlich Plasmin, umzuwandeln (122). Zu diesen Medikamenten zählen Urokinase, Streptokinase und Alteplase (122,123). Um die Auflösung von Thromben zu bewirken, wird typischerweise eine viel höhere Thrombolytikumdosis als die endogene Plasminogenaktivatorenkonzentration benötigt. Dies wird durch die ineffektive Inkorporation von exogenen Thrombolytika in den Thrombus bedingt (123). Im Gegensatz dazu werden endogene Plasminogenaktivatoren während der Thrombusformation in die Thrombusstruktur eingebaut, was eine effektivere Thrombolyse ermöglicht (124,125). Die Notwendigkeit einer höheren Dosis gilt insbesondere für ältere Thromben.

Die thrombolytische Therapie beinhaltet spezifische Risiken. Unter den häufigsten Nebenwirkungen zählt die erhöhte Blutungsneigung. Die vermehrte Bildung von Fibrin-Abbauprodukten, eine therapieinduzierte Koagulation, sowie eine Ausschöpfung von Koagulationsfaktoren sind alles Faktoren, die das hämostatische Gleichgewicht während der thrombolytischen Therapie beeinflussen können (123). Eine spezifische Nebenwirkung, die durch eine erhöhte exogene Thrombolytikumkonzentration bedingt ist, sind die sogenannten systemischen Effekte „*systemic effects*“ (123). Ursachen für systemische Effekte sind typischerweise eine verstärkte fibrinunabhängige Thrombolyse, die Stimulation von Fibrin-Abbauprodukten aus dem primären Thrombus und die reaktive Koagulation von während der Thrombolyse entstandenen Thromben und Fibrin (126). Durch diese systemischen Effekte entsteht ein erhöhtes Risiko für sekundäre Thrombosen oder Nachblutungen aufgrund einer Ausschöpfung von Koagulationsfaktoren. Aus diesem Grund erfolgt vor jedem klinischen Einsatz einer thrombolytischen Therapie eine Risikoabwägung. Plasminogen wird in seiner Wirkung durch die lokale Plasmakonzentration von Plasminogenaktivatoren (tPA und uPA) limitiert. Dies kann die fibrinunabhängige systemische Thrombolyse eingrenzen, was

letztlich systemische Effekte minimieren und somit zum besseren Sicherheitsprofil des Medikaments beitragen kann.

Eine Voraussetzung für die thrombolytische Therapie besteht in einem ausreichend hohen Plasminogenspiegel. Thrombolytische Therapien induzieren häufig einen sogenannten „lytischen Zustand“, der mit einer Senkung vom Plasminogen-Plasmaspiegel einhergeht. Dies resultiert in der Senkung der Effektivität der thrombolytischen Therapie (127). Der Eintritt vom lytischen Zustand wurde in einer *in vitro* Studie von *Onundarson et al.* 5 min nach dem Einsatz von Streptokinase und 20 min nach einer Plasminogenkonzentrationsenkung auf 24% des Ursprungswerts registriert (128). In der gleichen Arbeit konnte eine positive Korrelation zwischen höherer Plasminogenkonzentration und der bestimmten thrombolytischen Effektivität etabliert werden. Im Gegensatz wiesen ein progredienter lytischer Zustand und die Ausschöpfung vom lokalen Plasminogen einen negativen Effekt auf die Thrombolyse auf (128). Eine Plasminogendepletion im Plasma war auch nicht durch erhöhte Konzentrationen von Plasminogenaktivatoren zu kompensieren (127). Eine Wiederherstellung des *in vitro* Plasminogenspiegels resultierte in dem Rückgang des lytischen Zustands und somit in einer Erhöhung der thrombolytischen Aktivität (127). Somit lässt sich die Bedeutung vom lokalen Plasminogenspiegel für den regelrechten Ablauf der Thrombolyse veranschaulichen. Dies könnte insbesondere in Situationen mit einem erhöhten Plasminogenverbrauch wichtig sein, wie z.B. in der Therapie von CC-Thrombosen.

Die zentrale Rolle vom Plasminogen für den optimalen Ablauf der Thrombolyse wurde auch anhand eines Mausmodells der akuten zerebralen Thromboembolie demonstriert. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Korrelation zwischen dem Plasminogenspiegel und Hirnschäden, Fibrinolyse und Störungen der Blut-Hirn-Schranke. Höhere Plasminogenkonzentrationen wiesen hierbei eine protektive Auswirkung gegen ischämische Hirnschäden auf, gekennzeichnet durch reduzierte mikrovaskuläre Thrombosen und bessere Outcomes (129). Mittels eines murinen Modells der Lungenembolie ließ sich die Wiederherstellung des thrombolytischen Potenzials nach

Plasminogengabe ebenso beobachten, was in der Aufräumung von endogenen Fibrineinlagerungen in Lungengefäße resultierte (130). Plasminogen zeigt während thrombolytischen Ereignisse aufgrund der erhöhten Bindungsaffinität für Fibrin eine stark erhöhte Konzentration auf Thrombusoberflächen. Dies führt zur Mobilisation vom lokal verfügbaren Plasminogen, was im Endeffekt in einer lokalen Ausschöpfung von Plasminogenspeichern im Blutplasma resultieren kann (131). Diese Ausschöpfung kann eine Hürde für den optimalen Ablauf der fibrinolytischen Kaskade darstellen (132-134). Eine Ausschöpfung von lokalen Plasminogenspeichern während der CCE kann in unbehinderter Kristallthromboseformation und arteriellen Obstruktionen resultieren, was letztlich mit einer Nierenfunktionsabnahme und akuter Nierenschädigung einhergehen kann. Die vorliegende Arbeit hat demzufolge die Hypothese, dass eine rechtzeitige Plasminogensubstitution sich als potenzielle therapeutische Option gegen thrombotische Angiopathien, Akutes Nierenversagen und kortikale Nierennekrosen als Folge von CCE darstellt.

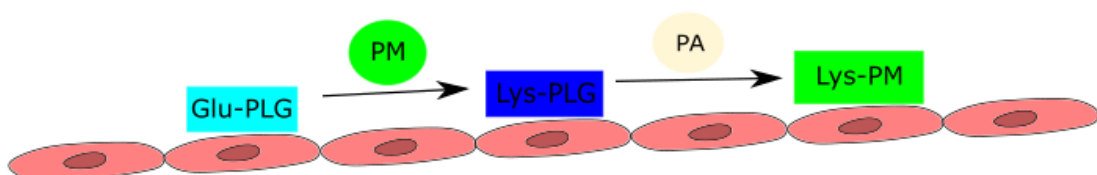
2.4.3 Glu-Plasminogen und Lys-Plasminogen

Obwohl Glu-Plasminogen (Glu-PLG) und Lys-Plasminogen (Lys-PLG) zwei Isoformen des gleichen Proenzym sind, weisen sie wichtige Unterschiede in ihrem Wirkmechanismus und ihren spezifischen Eigenschaften auf, die bei potenzieller Anwendung als therapeutisches Mittel für CCE zu berücksichtigen sind.

Plasminogen kommt in der Regel in zwei distinkten Konformationen vor, nämlich Glu-PLG und Lys-PLG. In seiner geschlossenen Konformation (auch „native Konformation“ bezeichnet) besitzt Plasminogen am N-Terminus einen Glutaminsäure-Rest. Diese Plasminogenform wird dementsprechend „Glu-Plasminogen“ bezeichnet. Lys-PLG besitzt dagegen Lysin-Reste am N-Terminus und wird häufig als die „offene“ Konformation vom Plasminogen bezeichnet (115,133). Lys-PLG besitzt im Vergleich zum Glu-Plasminogen (2,2 Tage) eine kürzere Halbwertszeit von 0,8 Tagen (115). Glu-PLG scheint die häufigere Konformation im Blutplasma zu sein, wobei Lys-PLG durch plasminvermittelte Spaltung der ersten 77 Aminosäure transitorisch gebildet wird

(Abb.5) (114). Glu-Plasminogen reguliert zum Großteil die Plasminsyntheserate mittels seiner spezifischen Bindungsaffinität zu Zelloberflächenrezeptoren (135). Glu-Plasminogen wird typischerweise vom Plasmin effizienter auf Zelloberflächen als in Lösungen gebunden, was die Aktivierungsreaktion auf Zelloberflächen im Vergleich zum Plasma erleichtert (135). Die Interaktion vom Glu-PLG mit Zelloberflächenrezeptoren induziert eine Konformationsänderung, die eine plasminvermittelte Spaltung vom Glu-Plasminogen begünstigt und somit die Konversion in die Lys-PLG-Konformation ermöglicht **(Abb.5)** (136-139). Lys-Plasminogen ist leichter durch tPA und uPA aktivierbar, was im Endeffekt in einer erhöhten Plasminsynthese auf Zelloberflächen resultiert (135). Zudem besitzt Lys-Plasminogen aufgrund von Konformationsunterschieden im Vergleich zum nativen Glu-Plasminogen eine 10-fach höhere Fibrinbindungsaffinität (140). Im Gegensatz dazu ist Glu-Plasminogen in Lösungen schwieriger ins Lys-Plasminogen konvertierbar, was die unspezifische Plasminproduktion und somit die Thrombolyse eingrenzt (135).

A Plasminogenaktivierung auf Zelloberflächen



B Plasminogenaktivierung in Lösungen

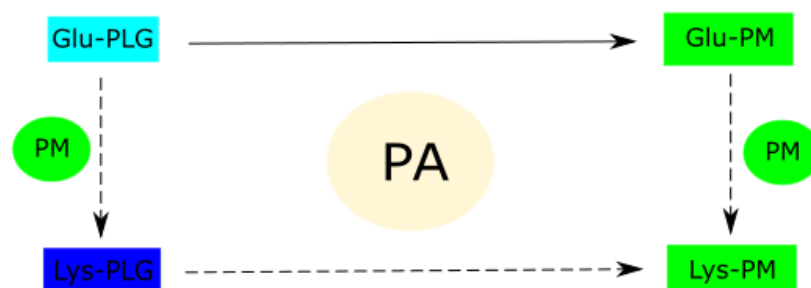


Abbildung 5: Aktivationsmechanismen vom nativen Glu-Plasminogen A: Auf Zelloberflächen findet eine gesteigerte Konversion vom Glu-Plasminogen zum Lys-Plasminogen statt. Das aktivierungsbereitere Lys-Plasminogen ist somit auf Zelloberflächen das dominante Substrat für Plasminogenaktivatoren. B: Im Gegensatz dazu bleibt Glu-Plasminogen in Lösungen als das Hauptsubstrat für Plasminogenaktivatoren. Demzufolge ist die Konversion zum Lys-Plasminogen auf Zelloberflächen ein essenzieller Teil der optimalen Stimulation der Plasminogenaktivierung. PA – Plasminogenaktivator, PM – Plasmin.

Obwohl Lys-Plasminogen essenziell für den Thrombolyseablauf auf Thrombusoberflächen ist, kann er bedingt durch seine höhere Bindungsaffinität zu Plasminogenaktivatoren auch in Lösungen unspezifisch aktiviert und ins Plasmin konvertiert werden. Diese unspezifischere Aktivierung im Vergleich zum Glu-Plasminogen könnte demzufolge in einer niedrigeren Lys-PLG-Konzentration am Thromboseort resultieren, wenn Lys-Plasminogen extern appliziert ist. Wenn Lys-Plasminogen in einem zum Fibrin ungebundenen Zustand im Plasma aktiviert wird, wird das dadurch entstehende Plasmin von Plasmininhibitoren irreversibel gehemmt und anschließend für die weitere Thrombolyse unbrauchbar gemacht (141-143). Diese Faktoren können für ein potenzielles Lys-PLG-Medikament eine niedrigere thrombolytische Effektivität bedeuten. Dass Lys-PLG teilweise bereits in Lösungen und an Zelloberflächen aktiviert wird, wird auch als eine Ursache für die hämorrhagischen Komplikationen vermutet, die häufig bei der Anwendung vom Lys-PLG beobachtet werden (144,145). Aufgrund der engen Interaktion zwischen den beiden PLG-Konformationen sollte die Auswirkung einer eventuellen Kontamination mit Lys-PLG in einem Glu-PLG-Medikament näher untersucht werden, weil dadurch die fibrinolytische Aktivität des Medikaments potenziell beeinflusst werden könnte.

Dem Glu-PLG wird in der Literatur eine höhere Spezifität in seiner fibrinolytischen Wirkung zugeschrieben. Das bessere Nebenwirkungsprofil vom Glu-PLG könnte das Komplikationsrisiko insbesondere bei multimorbiden und alten CCE-Patienten minimieren. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Hypothese gestellt, dass Glu-PLG sich als potenzielle Option in der Therapie von CCE darstellt. Eine genauere Untersuchung der thrombolytischen Effektivität, sowie die Erläuterung von eventuellen Unterschieden im Wirkungsprofil der beiden PLG-Formen in einem Mausmodell der CCE ist aus diesem Grund als sinnvoll anzunehmen.

2.5 Hypothese

Basierend auf der obengenannten Literatur und vorläufigen Studien wurde in diesem Projekt das Ziel gesetzt, die Wirksamkeit vom Plasminogen als Therapiemittel in einem

etablierten Mausmodell der CCE zu überprüfen. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass Plasminogen, durch Aufrechterhalten der Fibrinolyse, einen dosisabhängigen Schutz vor arteriellen Obstruktionen, GFR-Verlust und Nierenschäden nach CCE leisten und somit das Bild von akutem Nierenversagen und ischämischen Infarkten verhindern kann. Die vorliegende Arbeit besteht aus vier Teilstudien mit jeweils konkreten Zielen. Die Ergebnisse von den verschiedenen Studienteilen ergänzen sich gegenseitig und erlauben somit ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse während CCE, sowie die Bewertung vom Plasminogen als potenzielles Heilmittel für diese Erkrankung.

3. Material

Produkt	Hersteller
Waagen	
BP 110	S Sartorius, Göttingen, DE
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Zentrifugen	
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskope	
Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsysteme, Solms, DE
Progress CF (CCD-Kamera)	Jenoptik, Jena, DE
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
Wasserbad	
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Wetzlar, DE
Pipetten	
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen 1 - 1000 µl TypGilson	Peske, Aindling-Arnhofen, DE
GFR-Messung	
„NIC-Kidney“-GFR-Messgerät	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
„NIC-Kidney“-Akkus+ Ladegeräte	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
FITC- Sinistrin	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
„NIC-Kidney patch“ Lichtdurchlässige Klebefolie	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, DE
Isofluran CP	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Model 100 Isofluran Vaporizer	SurgiVet, Norwell, USA
Maus-Narkosekammer	SurgiVet, Norwell, USA
Blutentnahme	
Heparinisierte Kapillaren 0,8 mm	Wilhelm Ulbrich GdB, Mainz, DE
Micro sample tube, Citrat 3.2%, 1 mL	Sarsted AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

Produkt	Hersteller
Eppendorfröhren	TPP Trasadingen, CH
Mikroreaktionsgefäße 1,5 mL	
Reagenzien und Lösungen	
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Formalin	Merck, Darmstadt, DE
HCl	Merck, Darmstadt, DE
NaCl	Merck, Darmstadt, DE
KCl	Merck, Darmstadt, DE
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, DE
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, DE
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, DE
Glukose	Merck, Darmstadt, DE
Trisodium Citrat	Merck, Darmstadt, DE
Tris-buffered saline	Merck, Darmstadt, DE
HEPES	Merck, Darmstadt, DE
Microfil Injektionslösung	Flow-Tech, Carver, MA, USA
Immunohistologie	
Anti-mouse CD31, Clone SZ31 Dianova DIA-310	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Anti Ly-6B.2 Alloantigen Serotec MCA771G	Serotec, Oxford, UK
Anti-Fibrinogen Abcam ab27913	Abcam, Cambridge, UK
Anti-human SMA (clone 1A4) Dako M0851	Dako DE GmbH, Hamburg, DE
Schiffs Reagent Sigma Aldrich 3952016	Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA
Anti-human Plasminogen CoaChrom SAPG-AP	CoaChrom Diagnostica GmbH, Maria Enzersdorf, AT
Anti-mouse Plasminogen	Cloud-Clone Corp., Houston, USA
Cloud-Clone Corp. PAB236Mu01	
Anti-PLAT antibodies-online ABIN2855635	Antibodies-online, Aachen, DE
CCE-Induktion im Tiermodell und applizierte Medikamente	
Rasierklingen	Wilkinson, Solingen, DE
Leukoplast Klebeband	BSN medical, Hamburg, DE
BD Spritzen 1 mL, 2 mL, 5 mL	BD, Madrid, E

Produkt	Hersteller
BD Microlance Injektionsnadeln (20G- 30G)	BD, Drogheda, IR
Octagon 20 Advance Brüter	Brinsea, Weston, UK
Kleintier-OP-Tisch M12511	Medax, Neumünster, DE
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Medetomidin	Vetoquinol, Ismaning, DE
Midazolam	Roche, Mannheim, DE
Fentanyl	Hexal, Holzkirchen, DE
Atipamezol	ProVet AG, Lyssach, DE
Flumazenil	Roche, Mannheim, DE
Bepanthen	Bayer, Leverkusen, DE
Buprenorphin	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE
OP-Besteck (chirurgische Pinzetten, Scheren)	Miltex, Rietheim-Weiltheim, DE
5-0 Vicryl Faden resorbierbar	Ethicon Deutschland
5-0 Ethibond*Excel Faden nicht resorbierbar	Ethicon Deutschland
33G Injektionsnadel	TSK Laboratory, Japan
Roeko Gelatamp Gelatineschwamm	Coltene AG, Altstätten, CH
Cholesterinkristalle	Merck, Darmstadt, DE
1 x PBS 25 mM Lysine, Glycine Buffer pH 7.2	PreviPharma Consulting GmbH, 50 mM Mannheim, DE
Humanes Glu-PLG	PreviPharma Consulting GmbH, Mannheim, DE
Murines Glu-PLG	PreviPharma Consulting GmbH, Mannheim, DE
Humanes Lys-PLG	PreviPharma Consulting GmbH, Mannheim, DE
Sonstiges	
Einbettkassetten "Biopsy"	ISOLAB, Wertheim, DE
Objektträger Super frost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE

4. Methoden

4.1 Tierexperimentelle Methoden

4.1.1 Tierhaltung

In dieser Arbeit wurden ausschließlich C57BL/6J Wildtyp Mäuse eingesetzt. Die Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, DE) bezogen und vor Studienbeginn als gesund beurteilt. Die Tiere wurden für die gesamte Studiendauer in Polypropylenkäfigen (5 Tiere pro Käfig) unter SPF-Standartbedingungen gehalten. Diese Standartbedingungen beinhalten eine Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einen 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus, freien Zugang zum Wasser und Standardfutter (Sniff, Soest, DE). Käfige, Einstreu, Nestlets, Häuser, Nagestäbchen, Futter und Wasser, mit denen Tiere in Kontakt kamen, wurden im Vorfeld durch Autoklavieren bei 120 °C sterilisiert.

Alle Aspekte und angewandte Prozeduren wurden vor Beginn der Studie durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

4.1.2 Aufbereitung der Cholesterinkristalllösung

Die Cholesterinkristalle (CC) (in Pulverform) wurden in der gewünschten Konzentration (2 mg/mL) in steriler PBS-Lösung gelöst. Das Gewicht der PBS-Lösung wurde einmal vor der CC-Zugabe gemessen. Im Anschluss wurde die Messung mit den zugegebenen Cholesterinkristallen wiederholt.

Um Verklumpungen von CC und dadurch resultierende Verstopfungen der Nadel zu vermeiden, wurde die Lösung mehrmals durch Nadeln verschiedener Durchmesser filtriert, um die Partikelgröße zu reduzieren. Das Gewicht der Lösung wurde am Ende nochmals bestimmt. Falls wegen dem Filtrationsprozess das Gewicht der Lösung (durch Verlust von CC) reduziert wurde, wurde Cholesterinkristallpulver in die Lösung zugegeben, um für die verlorene Menge Cholesterinkristalle zu kompensieren. Der Prozess wurde anschließend wiederholt, bis das gewünschte Gewicht und somit die gewünschte CC-Konzentration in der Lösung erreicht werden konnte.

Die CC-Lösung wurde am Schluss dieses Prozesses bei 120 °C autoklaviert und unter 4 °C steril gelagert. Die Injektion für alle Tiere, die in der vorliegenden Arbeit miteingeschlossen waren, erfolgte mit einer Cholesterinkristallkonzentration von 10 mg/kg.

4.1.3 Aufbereitung und Applikation vom Plasminogen und PBS-Puffer

Alle in den vorliegenden Studien applizierten Plasminogenvarianten, sowie die PBS-Puffer-Kontrolllösung, wurden von PreviPharma Consulting GmbH (Mannheim, DE) bezogen und im injektionsbereiten Zustand zur Verfügung gestellt. Die Plasminogen-Injektionslösung wurde endotoxinfrei unter -80 °C gelagert. Kurz vor der Injektion wurden die Proben in einem Wasserbad bis 37 °C erwärmt. Nach dem Auftauen wurden die jeweiligen Plasminogen-Injektionslösung- oder PBS-Puffer-Kontrolllösung-Proben nur einmal verwendet und anschließend entsorgt, ohne diese wieder einzufrieren. Sowohl die Plasminogenlösung, als auch die PBS-Puffer-Kontrolllösung wurden intravenös verabreicht, was durch eine Injektion an der Schwanzvene mithilfe einer 30G Nadel erfolgte.

4.1.4 Induktion der renalen Cholesterinkristallembolie

Die Induktion der Cholesterinkristallembolie erfolgte in vollständig antagonisierbarer Vollnarkose. Diese wurde erreicht, indem die Tiere (7-8 Wochen alt, Wildtyp, männlich) eine intraperitoneale Injektion von Medetomidine (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) präoperativ verabreicht bekamen. Die Medikamente wurden von einer dafür berechtigten Person verabreicht. Die Narkoseinjektion erfolgte am linken Unterbauch des jeweiligen Versuchstiers. Das Tier wurde dafür am Nacken fixiert und mit dem Kopf nach hinten gekippt, um eine Organmobilisation weg von der Punktionsstelle zu ermöglichen. Dadurch wurden potenzielle Organverletzungen vermieden. Die Injektion erfolgte unter Aspiration in einem 45° Winkel. Das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde anhand vom Zwischen-Zehenreflex an der Hintergliedmaße überprüft. Der Reflex zeigte sich in der Regel ca. 20 min nach der Narkoseinjektion als stark vermindert, was die eingetretene chirurgische Toleranz

sicherstellte. Um einen narkosebedingten Körpertemperaturabfall zu vermeiden, wurden die Versuchstiere nach erfolgter Narkoseinjektion bis OP-Beginn in eine Brutmaschine (Octagon 20 Advance, Brinsea, Weston, UK) platziert. Augenaustrocknung wurde mittels Benetzung der Augen mit einer Bephanthen Augensalbe vermieden.

Während des operativen Eingriffs wurden die Versuchstiere auf einem auf 42 °C vorgeheizten Kleintier-OP-Tisch (Kleintier-OP-Tisch M12511, Medax GmbH) gelegt. Vor Operationsbeginn wurde die Inzisionsstelle rasiert und mit Ethanol desinfiziert. Im ersten OP-Schritt erfolgte ein 1cm Schnitt am linken Flankenbereich. Nach Durchtrennung der Haut- und Muskelschichten wurde die retroperitoneal liegende Niere lokalisiert, vorsichtig vom umliegenden Fettgewebe getrennt und dadurch mobilisiert. Im Anschluss erfolgte die Nierenreposition, um einen freien Zugriff auf die linke *A. renalis* zu gewährleisten (**Abb.6A**). Anschließend erfolgte die arterielle Injektion der Cholesterinkristalllösung (10 mg/kg) mithilfe von einer 33G Nadel. Die erfolgreiche Cholesterinkristallinjektion in die *A. renalis* wurde durch eine vorübergehende Farbänderung der Niere bestätigt (**Abb.6B**). Im Fall einer aufgetretenen Blutung wurde diese mithilfe von Gelatinschwämmen (Coltene AG) gestillt. Die rechte Niere und die beiliegende *A. renalis* wurden während der Operation nicht manipuliert. Im Anschluss wurde die Inzision mittels resorbierbarer Fäden (5-0 Vicryl, Ethicon) für die Muskelschicht und nicht resorbierbarer Fäden (5-0 Ethibond*Excel, Ethicon) für die Hautschicht verschlossen. Nach abgeschlossenem Wundverschluss wurden Atipamezol (2.5 mg/kg) und Flumazenil (0,5 mg/kg) als Narkoseantagonisierungsmittel und Buprenorphin (1 mg/kg) als Mittel der Wahl für die Schmerzkontrolle subkutan verabreicht. Bis zum vollständigen Erwachen nach Narkoseantagonisierung wurden die Versuchstiere zurück in die Brutmaschine gesetzt. Buprenorphin wurde zusätzlich alle 8 h post-operativ zur Aufrechterhaltung der Schmerzkontrolle appliziert.

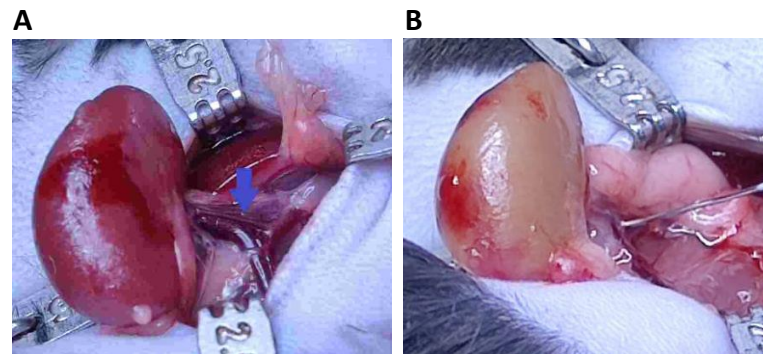


Abbildung 6: Operative Induktion der Cholesterinkristallembolie A: Lage der linken Niere und *A. renalis* (blauer Pfeil) während des Operationsvorgangs. B: Farbänderung der Niere als Bestätigung für eine erfolgreiche Injektion von Cholesterinkristalllösung in die linke *A. renalis*

4.1.5 Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Für die Bestimmung der GFR wurde ein System mit 2 Komponenten verwendet. Das System beinhaltet einen miniaturisierten Lichtsensor (Imager) und den FITC-gelabelten GFR-Marker Sinistrin (150). Der miniaturisierte Imager besteht aus zwei lichtemittierenden Dioden, einer Photodiode und einer Batterie (MediBeacon, Mannheim, Deutschland).

Im ersten Schritt wurden die Mäuse in eine luftdichte Narkosekammer gesetzt und mittels Inhalationsnarkose (3% Isofluran in medizinischem Sauerstoff 4 L/min) narkotisiert. Nach Erreichen vom narkotischen Zustand wurde das Versuchstier aus der Kammer rausgenommen und zunächst das Gewicht bestimmt. Um den Imager auf die geeignete Stelle zu kleben, wurden im nächsten Schritt die Rückenhaare von einer 1,5 cm * 2,5 cm Fläche unter dem Nacken mittels eines Einmalrasierers wegrasiert. Der Imager wurde anschließend an der Stelle mit einem doppelseitigen Klebeband befestigt. Nach Starten der Aufzeichnung wurde eine 5-minütige Hintergrundmessung der Fluoreszenz aufgenommen, während welcher sich die Versuchstiere in separaten frisch autoklavierten Käfigen befanden. Nach Ablauf der Hintergrundmessung wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und erhielten anschließend eine i.v. Tracerinjektion vom 150 mg/kg Körpergewicht FITC-markierten Sinistrin (Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH). Die darauffolgende Messung dauerte ca. 90 min und erfolgte ebenfalls in einzelnen Käfigen, um Schaden beim Versuchstier und Gerät zu vermeiden.

Während dieser Zeit nahm das Imager-Gerät den Anstieg und Abfall des Fluoreszenzsignals des FITC-Sinistrins auf, was später als eine Fluoreszenzkurve abgebildet wurde (**Abb.7**). Mithilfe von dieser generierten Kurve ließ sich die renale Clearance bestimmen. Nach Beendigung der Messung wurde das Gerät vom Tier entfernt und das Tier zurück in den ursprünglichen Käfig gesetzt. Die aufgenommenen Daten wurden mittels der MPD-Lab Application analysiert. Anhand dieser Software wurde aus der Eliminationskurve die FITC-Sinistrin Plasma-Halbwertszeit bestimmt.

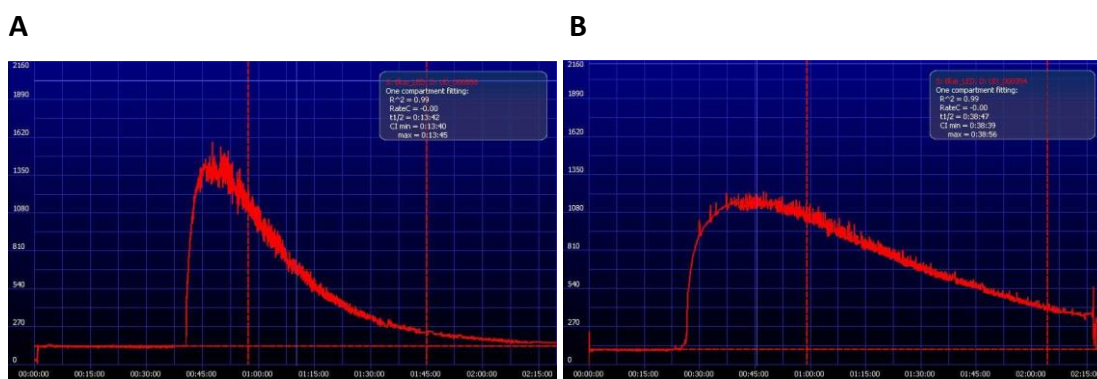


Abbildung 7: Bestimmung der GFR Die rote Kurve zeigt den Verlauf der gemessenen FITC-Sinistrin Fluoreszenz im Blut. Die Kurve bildet dadurch die Exkretionsfähigkeit der Niere ab. Ca. 5 min nach der FITC-Sinistrin-Injektion kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz (A und B), wobei in der gesunden Niere (A) nach erfolgter glomerulären Filtration die Fluoreszenz wieder rasch abnimmt. Im Gegensatz beobachtet man in der von CCE betroffenen Niere (B) eine flachere Exkretionskurve, was auf die reduzierte Nierenfunktion zurückgeht. Nach Etablierung der Fluoreszenz-Baseline und Festlegung der geeigneten Referenzpunkte (hier als vertikale Linien abgebildet) lässt sich anhand von der MPDLab Software die Plasmahalbwertszeit von FITC-Sinistrin bestimmen. Dies erlaubt dann mittels der unten angegebenen Formel die Bestimmung der murinen GFR für den angegebenen Zeitraum.

Die GFR konnte anschließend mittels dieser Halbwertszeit und nach Einbeziehen des Körpergewichts vom jeweiligen Tier und eines empirischen Umrechnungsfaktors nach der folgenden Formel ermittelt werden (147):

$$GFR (\mu\text{L}/\text{min}) = (146,168 \times \text{KG} (g)) / t_{1/2}(\text{min})$$

4.1.6 Nierentnahme

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation geopfert. Bei der Nierentnahme erfolgte im ersten Schritt eine mediane Resektion des Versuchstiers und die Lokalisierung der *V. cava inferior*. Die *V. cava*

inferior wurde dann durchtrennt. Zunächst wurden 5 mL PBS-Puffer in die linke Herzkammer injiziert, um die Nieren durchzuspülen und Erythrozytenreste auszuschwemmen. Die Nieren wurden anschließend entnommen und von den Nierenkapseln vorsichtig getrennt. Demnächst wurden makroskopische Bilder der Nieren aufgenommen. Die Nieren wurden danach mit einem Skalpell longitudinal in zwei Teile getrennt und für 24 h in einer Einbettkassette in 4% neutral gepuffertem Formalin eingelegt.

4.2 Histologische Methoden

Die Aufbereitung der Proben zur Herstellung der verschiedenen histologischen Präparate, sowie die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen, die im folgenden Teil der Arbeit beschrieben werden, wurden nicht vom Verfasser der Arbeit selbst erledigt. Dies wurde nach Absprache mit dem zuständigen Betreuer von Frau Janina Mandelbaum und Frau Anna Afimadou (Medizinisch-Technische Assistentinnen, Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Universität München) durchgeführt.

4.2.1 Nierengewebeaufbereitung und Herstellung von Präparaten

Nach 24 h Fixation in 4% neutral gepuffertem Formalin wurden die Nieren mittels Leica Gewebeeinbettautomat prozessiert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Es wurden Nierenparaffinschnitte mit 2µm Dicke aufbereitet, deparafiniert und 5-mal je 3 min in Xylene gelegt. Die Rehydrierung erfolgte nach dem folgenden Bearbeitungsschema: die Schnitte wurden 3-mal je 3 min in 99% Ethanol, 2-mal je 3 min in 95% Ethanol und 3 min in 70% Ethanol gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend zweimal je 5 min im PBS-Puffer gewaschen. Als nächstes fand unter Lichtschutzbedingungen die Blockierung der endogenen Peroxidase in H₂O₂ und Methanol-Mischung (20 mL 30% H₂O₂ gelöst in 180 mL Methanol) statt, anschließend wurden die Schnitte zweimal je 5 min im PBS-Puffer gewaschen. Die endogene Biotin-

Blockierung erfolgte mittels einem Tropfen Avidin für 15 min und zusätzlich Biotin für noch 15 min. Die Schnitte wurden nach der Inkubation noch zweimal im PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 12 Stunden bei 4 °C mit Primärantikörpern in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen je 5 min in PBS wurden die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur mit biotinylierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend noch zweimal je 5 min im PBS gewaschen. Danach folgte eine 30-minütige Inkubation mit Substratlösung bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer und einmaliges PBS-Waschen für 5 min. Nach dem 5-minütigen Auswaschen der Schnitte im Tris-Puffer wurden diese mit DAB (3,3'-Diaminobenzidine) gefärbt, gefolgt von Gegenfärbung mit Methylgrün. Zum Zweck der Entfernung von überschüssiger Farbe und Xylene wurden die Schnitte in 96% Ethanol gewaschen und anschließend austrocknen gelassen. Am Ende wurden alle Objektträger mit den jeweiligen Färbungen mit Hilfe von VectaMount eingedeckelt.

4.2.2 Histologische Färbungen

Alpha-smooth muscle actin (α SMA) / Fibrin-Färbung

Die α SMA/Fibrin Färbung ließ die genaue Quantifizierung arterieller Obstruktionen in der durch die Cholesterinkristallembolie betroffenen Niere zu. Dadurch ließ sich auch der Zeitrahmen, in dem sich die Thromben bilden und entwickeln, genau verfolgen. Zusätzlich konnte so die Effektivität der Plasminogenbehandlung gut beurteilt werden, weil das Verhältnis zwischen obstruierten und obstruktionsfreien Gefäßen entscheidend für die Perfusion der Glomeruli und somit für die allgemeine Nierenfunktion ist. Die Färbung besteht aus zwei Komponenten, Alpha-SMA erlaubt die Bestimmung der Arterienzahl durch Anfärbung der glatten Muskulatur, während die Fibrinfärbung die Obstruktionen durch Anfärbung der intraluminalen Thromben, die sich um die Cholesterinkristalle bilden, beurteilen ließ.

Tabelle 2: Quantifizierung arterieller Obstruktionen

		Interlobar (Zahl)	Arkuat (Zahl)	Interlobulär (Zahl)
Gesamtzahl		A+B+C	A'+B'+C'	A''+B''+C''
Arterieller Obstruktionsgrad	Obstruktionsfrei (<20% Obstruktion)	A	A'	A''
	Partiell (20 bis 80% Obstruktion)	B	B'	B''
	Komplett (>80% Obstruktion)	C	C'	C''
Verhältnis der arteriellen Obstruktionen (%)	Obstruktionsfrei (<20% Obstruktion)	$A/(A+B+C)$	$A'/(A'+B'+C')$	$A''/(A''+B''+C'')$
	Partiell (20 bis 80% Obstruktion)	$B/(A+B+C)$	$B'/(A'+B'+C')$	$B''/(A''+B''+C'')$
	Komplett (>80% Obstruktion)	$C/(A+B+C)$	$C'/(A'+B'+C')$	$C''/(A''+B''+C'')$

Die Arterien wurden zum Zweck der Quantifizierung von Thrombosen in drei Gruppen, je nach Größe, eingeteilt (**Tab.2**) (**Abb.8**). Diese waren interlobare, arkuate und interlobuläre Arterien. Der Obstruktionsgrad in jeder Arteriengruppe wurde als komplett, partiell oder obstruktionsfrei eingestuft (**Abb. 8**).

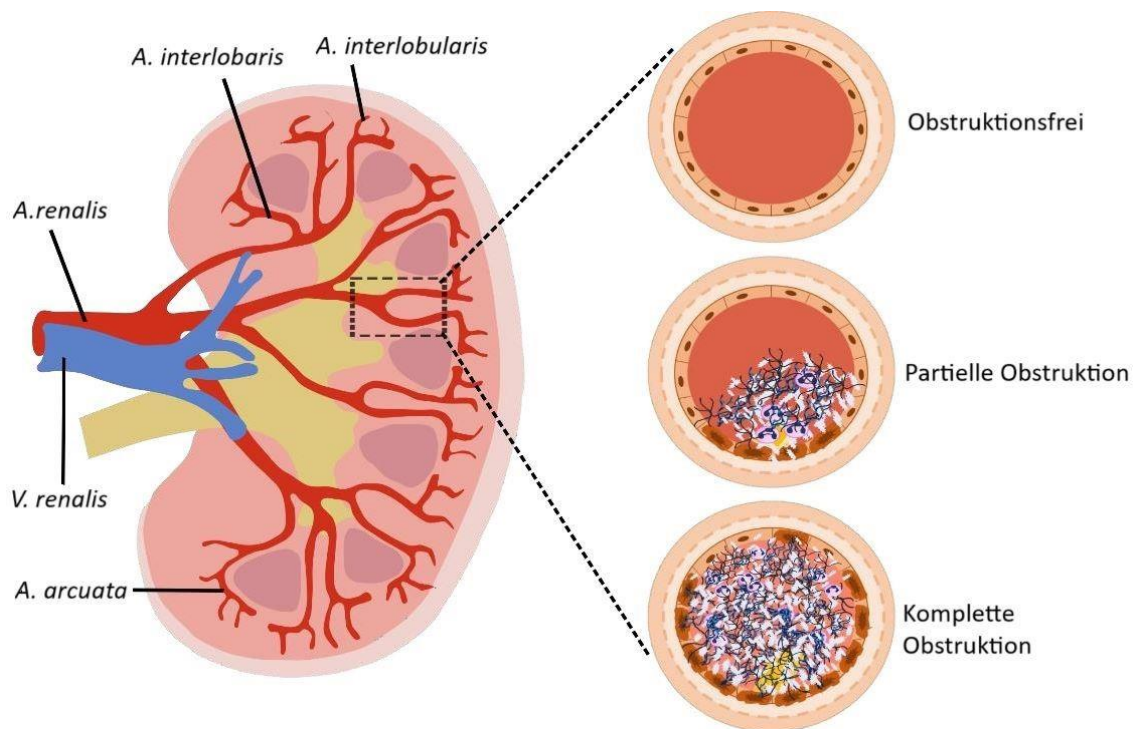


Abbildung 8: Beurteilung vom Arterientyp und Obstruktionsgrad. Die beurteilten Arterien wurden je nach Durchmesser entweder als Interlobar-, Arkuat- oder Interlobulärarterien eingestuft. Nach der Zuordnung der jeweiligen Arterie zu einer der obengenannten Gruppen erfolgte die Einschätzung des Obstruktionsgrads. Adaptiert von Shi (57).

Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)

Nierenparaffinblöcke von 2 µm Dicke wurden mit Hilfe von Gewebeprozessoren aufbereitet. Die Schnitte wurden in Xylol 3-mal je 5 min deparaffiniert. Im Anschluss erfolgte eine Rehydratation nach dem folgenden Schema: die Schnitte wurden 3-mal je 3 min in 100% Ethanol, 2-mal je 3 min in 95% Ethanol und anschließend einmal für 3 min in 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser waren die Schnitte für die PAS-Reaktion bereit.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit 2% Periodsäure für 5 min inkubiert und mit destilliertem Wasser 5 min gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte mit der Schiff-Reagenz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit Leitungswasser 7 min gewaschen und mit einer Hämatoxylin-Lösung 2 min gegengefärbt. Nachdem die Schnitte noch einmal 5 min mit Leitungswasser gewaschen

wurden, wurden die angefärbten Schnitte in 90% Ethanol eingetaucht. Anschließend wurden sie abgetrocknet und mit Deckglas bedeckt.

Evaluierung von Nierenstrukturschäden mittels der Periodsäure-Schiff-Reaktion

Die Nierenstrukturschäden wurden auf Basis von interstitiellen und tubulären Schäden beurteilt. Es wurden folgende Parameter semi-quantitativ evaluiert: tubuläre Nekrosen, tubuläre Dilatation, Zylinderbildung, Bürstensaumverlust und interstitielles Ödem (**Abb.9**). Für jede Niere wurden alle Parameter untersucht. Es wurde dann für jedes Kriterium je nach Schadensausmaß einen Score von 1 bis 5 vergeben (**Tab.3**). Der Gesamtscore ergab sich aus der Zusammensetzung aller separater Nierenschadenkriterien. Die Nierenschnitte wurden am Leica DII Lichtmikroskop untersucht.

Tabelle 3: Evaluierung vom Nierenstrukturschaden

Parameter	Schwere vom Nierenstrukturschaden	Score	Prozentwert
A: tubuläre Nekrose	Keine	0	0
B: tubuläre Dilatation	Gering	0,5	0-10
C: Zylinderbildung		1	10-20
D: Bürstensaumverlust	Mäßig	1,5	20-30
E: interstitielles Ödem		2	30-40
	Deutlich	2,5	40-50
		3	50-60
	Stark	3,5	60-70
		4	70-80
	Sehr stark	4,5	80-90
		5	90-100

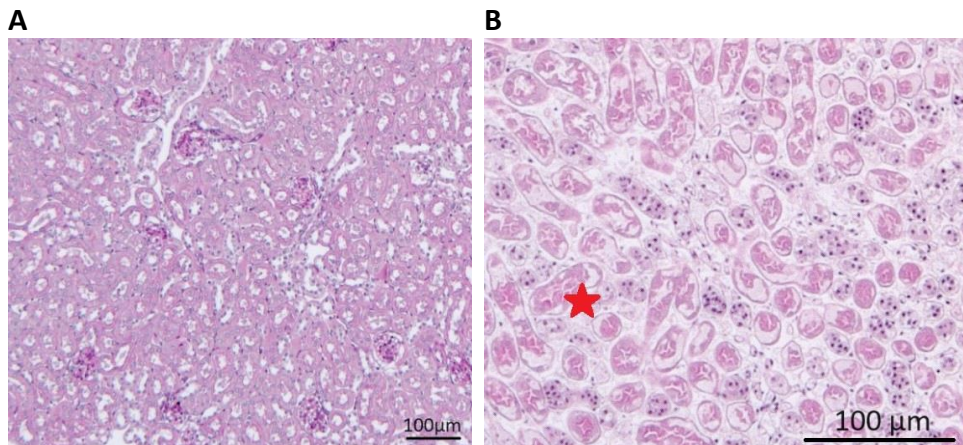


Abbildung 9: Beurteilung vom Nierenschaden mittels PAS-Färbung. Anhand der PAS-Färbung wurde das Ausmaß der CCE-verursachten Nekrosen, Ödem, Bürstensaumverlust, Tubulusdilatation und Zylinderbildung ausgewertet. Eine gesunde Niere (A) weist eine normale Parenchymarchitektur ohne Tubulusdilatationen oder Ödeme auf. Eine infarzierte Niere (B) zeichnet sich typischerweise durch Tubulusnekrosen (roter Stern) und interstitielles Ödem aus.

Bestimmung der Endothelzellviabilität mittels CD31 Färbung

Um die Viabilität der Mikrovaskulatur und somit potenzielle Auswirkungen von Endothelzellverlust zu untersuchen, wurde der endotheliale CD31 Marker verwendet (**Abb. 10**). Dieser Marker befindet sich auf der Oberfläche von gesunden Endothelzellen.

Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ (Fiji). Durchlichtmikroskopische Aufnahmen wurden angefertigt und entsättigt, um ein Graustufenbild zu generieren. Die Nierenparenchymfläche wurde manuell ausgeschnitten und separat betrachtet. Es erfolgte die Reduktion des Bildes von 255 auf 3 Grauwerte (Weiß-Grau-Schwarz). Dies erlaubte, die dunkleren Bildteile, die auf dem Schnitt einem hohen DAB-Umsatz zugeordnet werden konnten, im Vergleich zum Originalbild je nach Flächengröße korrekt aufzunehmen. Zunächst wurde der Grau-Anteil des Bildes abgetrennt, um ein reines Binärbild zu generieren. Parallel wurde auch das komplette Nierenparenchym schwarz eingefärbt, damit auch hier ein Binärbild generiert werden konnte. Dies ergab am Ende zwei Binärbilder. Die schwarzen Pixel vom ersten Bild entsprachen den dunkel gefärbten Stellen im Originalbild. Im Gegensatz konnte im anderen Bild die Parenchym-Referenzfläche in schwarz präsentiert werden.

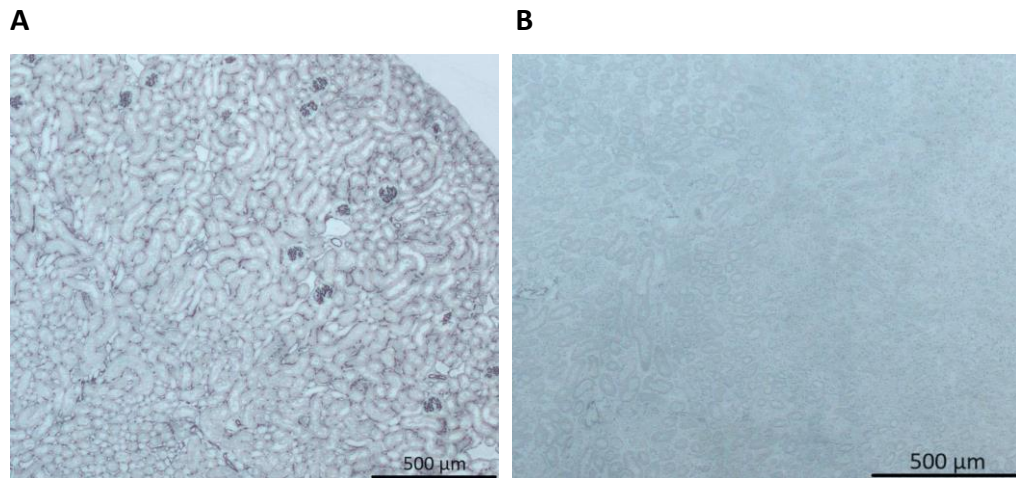


Abbildung 10: Auswertung der Mikrovaskulaturviabilität mittels der CD31-Färbung. Mittels der Quantifizierung der Prozentzahl von CD31+ Endothelzellen lässt sich der Effekt von Cholesterinkristallen auf die Mikrovaskulatur untersuchen. Die gesunde Niere (A) weist eine höhere Anzahl von lebenden Endothelzellen (schwarz angefärbt) im Vergleich zur mit CC-behandelten Niere (B) auf.

Schwarze Pixel von der gesamten aufgenommenen Fläche beider Bilder konnten mithilfe von ImageJ prozentuell dargestellt werden. Mithilfe dieser prozentuellen Ergebnisse ließ sich der Anteil CD31-positiver Zellen im gesamten Nierenparenchym erfassen.

Evaluierung der Neutrophileninfiltration mittels Ly6B2+ Antikörper

Durch Beurteilung der Neutrophileninfiltration ließ sich der Entzündungsvorgang nach CCE-Induktion beobachten. Somit konnte in den folgenden Teilstudien auch die Auswirkung der Plasminogentherapie auf das Neutrophileninfiltrationsausmaß bestimmt werden (**Abb.11**). Die Neutrophile infiltrieren die Perinfarktzone während der ersten Tage nach einem ischämischen Ereignis. Die semi-quantitative Auswertung von Ly6B2-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software und wurde nach den gleichen Schritten wie die Quantifizierung der CD31-positiven Zellen durchgeführt.

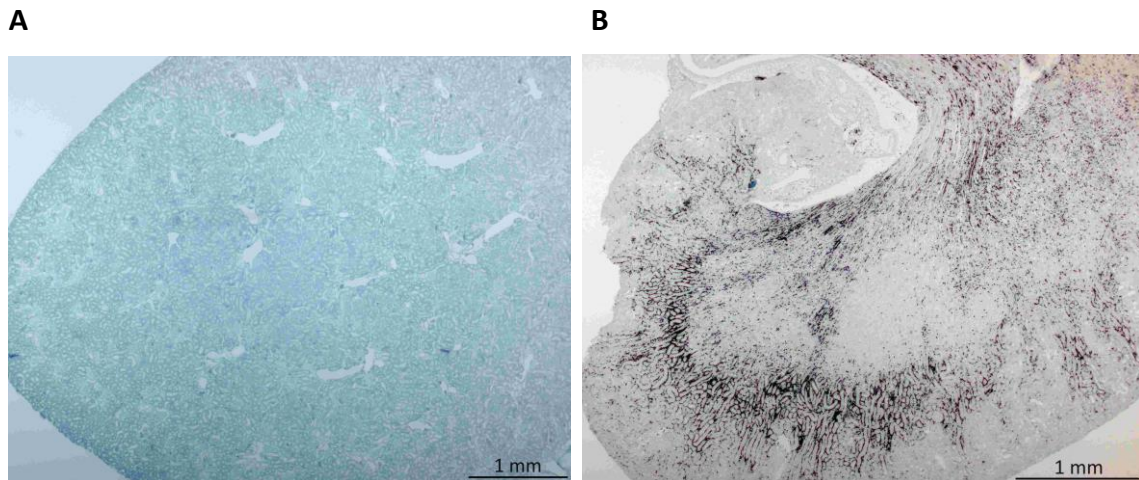


Abbildung 11: Auswertung der Neutrophileninfiltration mittels der Ly6B-Färbung Mittels der Quantifizierung der periläsionären Neutrophileninfiltration lässt sich der inflammatorische Verlauf nach der CC-Injektion verfolgen. In einer gesunden Niere (A) lassen sich fast keine Neutrophileninfiltrate nachweisen. Im Gegensatz kommt es in der Niere nach CCE-Induktion (B) zur ausgeprägten Infiltration von Neutrophilen (schwarz angefärbt) am Läsionsort, sowie diffus über das Nierenparenchym.

4.3 Design von experimentellen Teilstudien

4.3.1 Teilstudie 1 – Zeitdynamik der Thromboseentwicklung

Als Ziel der ersten Teilstudie wurde festgelegt, die Zeitdynamik der intraluminalen Thrombusbildung (Anzahl der durch Thromben verschlossenen Arterien) zu erfassen, um den optimalen Interventionszeitpunkt für den Einsatz vom Plasminogen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden in PBS gelösten Cholesterinkristalle (10 mg/kg) in die linke *A. renalis* von Versuchstieren injiziert, um dadurch CCE herbeizuführen. Drei Stunden nach der intraarteriellen Injektion wurde jedem Tier jeweils 200 μ L PBS-Puffer-Kontrolllösung intravenös verabreicht. Zudem wurde eine Kontrollgruppe untersucht, in der keine i.a. CC-Injektion erfolgte. Die folgenden Zeitpunkte nach der Kristallinjektion wurden in dieser Teilstudie untersucht (**Tab.4**).

Tabelle 4: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 1

Zeitpunkt nach Kristallinjektion	Intraarterielle Injektion	Intravenöse Injektion	Gruppengröße
2 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
4 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
6 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
12 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
18 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
48 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7
48 h	keine	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	7

Nach dem Erreichen vom jeweiligen Zeitpunkt wurde die GFR in den 18 h- und 48 h-Gruppen gemessen. Die Tiere wurden nach Beendigung des Versuchs mittels zervikaler Dislokation geopfert. Die linken Nieren wurden entnommen und immunhistologisch analysiert (**Abb.12**).

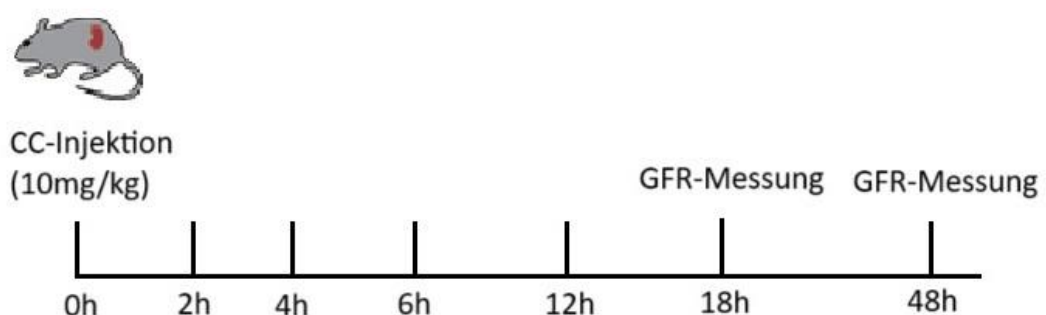


Abbildung 12: Versuchsaufbau von Teilstudie 1. Zusätzlich zu der GFR-Messung bei den 18 h- und 48 h-Zeitpunkten erfolgte bei allen untersuchten Zeitpunkten eine Organentnahme und eine immunohistochemische Analyse.

4.3.2 Teilstudie 2 – Einsatz vom Glu-Plasminogen

Als Ziel des zweiten Studienteils wurde festgelegt, nach Bestimmung des optimalen Zeitpunkts zum Therapiebeginn mittels Analyse der Nierenschäden- und Gefäßobstruktionsprogression - die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von humanem Glu-PLG und murinem Glu-PLG auf die verschiedenen Merkmale der ANS zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Teilstudie wurden für die folgenden Teilstudien als ausschlaggebend angenommen, was die Effektivität von verschiedenen Glu-PLG-Dosen betraf. Im ersten Schritt vom Versuch erfolgte ebenfalls die Induktion von CCE mithilfe einer i.a. Injektion von CC (10 mg/kg). Die Versuchstiere wurden jeweils 4 h post-OP mit humanem (**Tab.5**) oder murinem (**Tab.6**) Glu-Plasminogen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. 24 h nach der i.a. Kristallinjektion wurde in allen Gruppen die GFR gemessen (**Abb.13**). Anschließend wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation geopfert und die Nieren zur immunhistologischen Analyse entnommen. In diesem Studienteil wurden folgende Konzentrationen von humanem und murinem Glu-PLG untersucht:

Tabelle 5: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 2 (humanes Glu-Plasminogen)

Dosis Hu Glu-PLG (mg/kg) i.v. 4 h post-OP	Intraarterielle Injektion	Gruppengröße
0,075	CC (10 mg/kg)	7
0,150	CC (10 mg/kg)	7
0,300	CC (10 mg/kg)	7
0,600	CC (10 mg/kg)	7
0,800	CC (10 mg/kg)	7
1,500	CC (10 mg/kg)	7
1,500	keine	7

Tabelle 6: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 2 (murines Glu-Plasminogen)

Dosis Mu Glu-PLG (mg/kg) i.v. 4 h post-OP	Intraarterielle Injektion	Gruppengröße
0,075	CC (10 mg/kg)	7
0,300	CC (10 mg/kg)	7
1,500	CC (10 mg/kg)	7
1,500	keine	7

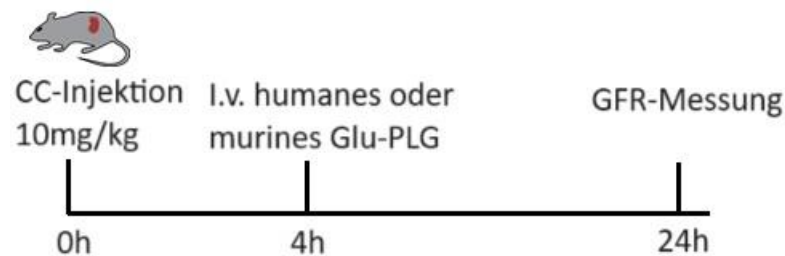


Abbildung 13: Versuchsaufbau von Teilstudie 2

4.3.3 Teilstudie 3 – Zeitdynamik der Thrombolyse

Nachdem in Teilstudien 1 und 2 das Ziel festgelegt wurde, die geeignete Konzentration für eine effektive Thrombolyse (Studie 2) und den optimalen Zeitpunkt für den Therapiebeginn (Studie 1) festzustellen, sollte in Teilstudie 3 die Thrombolysedynamik im Zeitverlauf nach der Plasminogeninjektion näher erläutert werden. Dies konnte mehr Information bzgl. der eventuellen Notwendigkeit von weiteren Plasminogeninjektionen oder einer Dauertherapie zum Aufhalten der fibrinolytischen Wirkung liefern. Die optimale Behandlungsdosis und der optimale Zeitpunkt der PLG-Gabe konnten anhand der Ergebnisse aus den Teilstudien 1 und 2 festgelegt werden. Nach Versuchsende wurden die Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt geopfert. In den 18 h-, 24 h- und 48 h-Gruppen erfolgte zusätzlich eine GFR-Messung (**Abb.14**). Nach Beendigung des Experiments wurden die Nieren zum Zweck der immunhistochemischen Analyse gesammelt und verarbeitet (**Tab.7**).

Tabelle 7: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 3

Zeitpunkt nach Kristallinjektion	Intraarterielle Injektion	Intravenöse Injektion	Gruppengröße
6 h	CC (10 mg/kg)	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
12 h	CC (10 mg/kg)	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
18 h	CC (10 mg/kg)	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
24 h	CC (10 mg/kg)	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
48 h	CC (10 mg/kg)	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
48 h	keine	Hu Glu-PLG (0,600 mg/kg)	6
48 h	CC (10 mg/kg)	200 µL PBS-Buffer Kontrolllösung	6

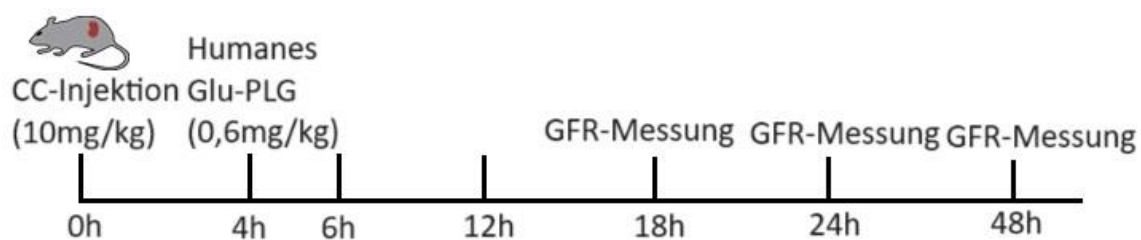


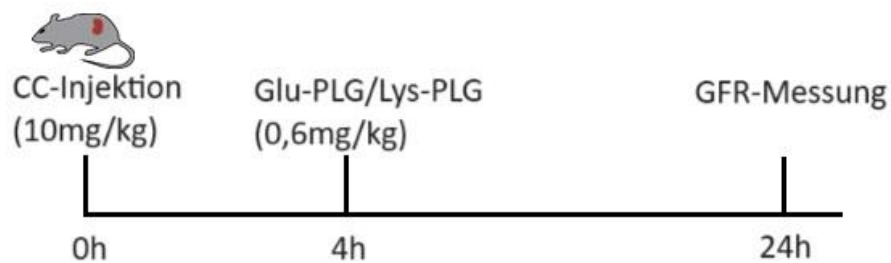
Abbildung 14: Versuchsaufbau von Teilstudie 3

4.3.4 Teilstudie 4 – humanes Glu-Plasminogen und Lys-Plasminogen

Inwiefern sich die beiden Plasminogentypen gegenseitig beeinflussen und welche Auswirkung diese Interaktion auf die Thrombolyse haben könnte, wurde bisher nicht genau erforscht. In der letzten Studie wurde dies mithilfe von verschiedenen Mischungsverhältnissen vom Glu-PLG und Lys-PLG unter den in den ersten drei Studien herausgearbeiteten Therapiebedingungen getestet. Hierzu wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse Glu-PLG und Lys-PLG jeweils 4 h nach Auslösung der CC-Embolie verabreicht. Die GFR-Messung erfolgte jeweils 24 h nach der CC-Injektion (**Abb.15**). Nach Beendigung des Experiments wurden die Versuchstiere geopfert und die Nieren entnommen und histologisch analysiert. In Studie 4 wurden 3 distinkte Mischungsverhältnisse und eine Kontrollgruppe (ohne Plasminogen-Therapie) untersucht (**Tab. 8**).

Tabelle 8: Experimentelle Gruppen in Teilstudie 4

Verhältnis Glu-PLG:Lys-PLG (0,600 mg/kg) i.v. 4 h post-OP	Intraarterielle Injektion	Gruppengröße
80:20	CC (10 mg/kg)	6
60:40	CC (10 mg/kg)	6
0:100	CC (10 mg/kg)	6

**Abbildung 15: Versuchsaufbau von Teilstudie 4**

4.4 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit enthaltenen statistischen Analysen und Abbildungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 8.0 Software (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt. Vor jeder statistischen Analyse wurde die Normalverteilung (Shapiro-Wilk Test), Homo- und Heteroskedastizität (Levene Test) und das Vorhandensein von Ausreißern (Grubbs Test) überprüft. Normalverteilte und homoskedastische Testwerte wurden für die statistische Signifikanz mit dem ANOVA (3 oder mehr Gruppen) und T-test (2 Gruppen) verglichen. Der post-hoc Bonferroni Test wurde bei multiplen Vergleichen verwendet. Heteroskedastische Datensätze wurden mittels Games-Howell post-hoc Test korrigiert. Nicht normal verteilte Datensätze wurden mit dem Kruskal-Wallis Test verglichen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt.

5. Ergebnisse

Das von *Shi et al.* entwickelte Mausmodell erlaubt eine Reproduktion der pathophysiologischen Vorgänge der renalen Cholesterinkristallembolie. Die CC-Injektion in diesem Modell betrifft nur eine Niere, wodurch sich die häufig bei CCE vorkommenden Hautläsionen, Ulzerationen, Peritonitis oder Urämie vermeiden lassen (82).

5.1 Zeitdynamik der CCE-bedingten akuten Nierenschädigung

5.1.1 GFR-Abfall und Mikrothromboseformation infolge von CCE

Die akute Nierenfunktionsminderung ist eine wichtige Ursache für die Einleitung von einer Hämodialyse (146). Der GFR-Wert spielt eine wichtige Rolle bei der Diagnostizierung und Stadieneinteilung des ANS und CNV (1,4-6, 149-151). 18 h nach der CC-Injektion (10 mg/kg) wurde einen GFR-Abfall von ca. 40% registriert (**Abb.16**). In den darauffolgenden Zeitpunkten fand keine weitere Reduktion der GFR statt.

Um die Zeitdynamik der Thromboseentwicklung zu untersuchen, wurden Nieren aus verschiedenen Zeitpunkten nach CC-Injektion analysiert. Die Anzahl der arteriellen Obstruktionen wurde mithilfe der AlphaSMA/Fibrin-Färbung bestimmt.

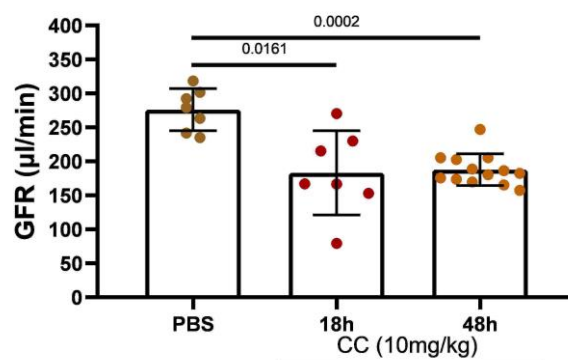


Abbildung 16: Zeitdynamik des GFR-Verlusts nach CCE. Quantitative Analyse der GFR nach der Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Messungen ± SEM dar. CCE-Induktion führt zu einem signifikanten GFR-Abfall gegenüber nicht behandelten Kontrolltieren.

Aufgrund der Gewebprozessierung mit Alkohol waren Cholesterinkristalle auf Parafinschnitten kaum darzustellen, da Alkohol entfettende Eigenschaften besitzt. Frühere Studien haben gezeigt, dass arterielle Thrombosen sich um Cholesterinkristalle bilden (82). Zum Zweck der Quantifizierung von arteriellen Verschlüssen wurde das Verhältnis zwischen obstruktionfreien und partiell-/vollobstruierten Gefäßen bestimmt. Nichtsdestotrotz sind komplette Obstruktionen für die glomeruläre Perfusion und dadurch für die GFR entscheidend.

Im Zeitverlauf nach CC-Injektion zeigte sich eine kontinuierliche Ausbreitung der Thrombosen von den interlobulären in die arkuaten und interlobaren Gefäße (**Abb. 17**). Partielle Obstruktionen wurden in Gefäßen aller Größen schon 2 h nach CC-Injektion nachgewiesen. Der Zeitpunkt bis zum Nachweis der kompletten Verschlüsse der Nierenarterien blieb etwas länger aus, diese wurden nach ca. 12 h in den interlobaren Arterien und nach ca. 4-6 h in den interlobulären Arterien festgestellt (**Abb. 18**).

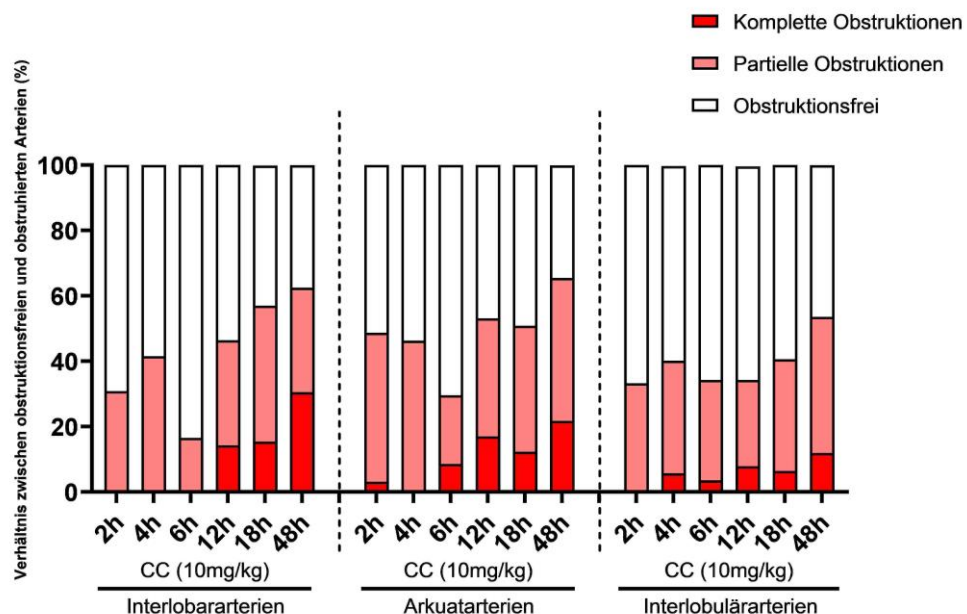


Abbildung 17: Dynamik der Thrombusbildung nach CCE (graphische Darstellung)
Semiquantitative Analyse des arteriellen Obstruktionsgrads für die verschiedenen Zeitpunkte nach einer CC-Injektion. Partielle und komplette Obstruktionen sind im Verhältnis zu den obstruktionsfreien Gefäßen dargestellt.

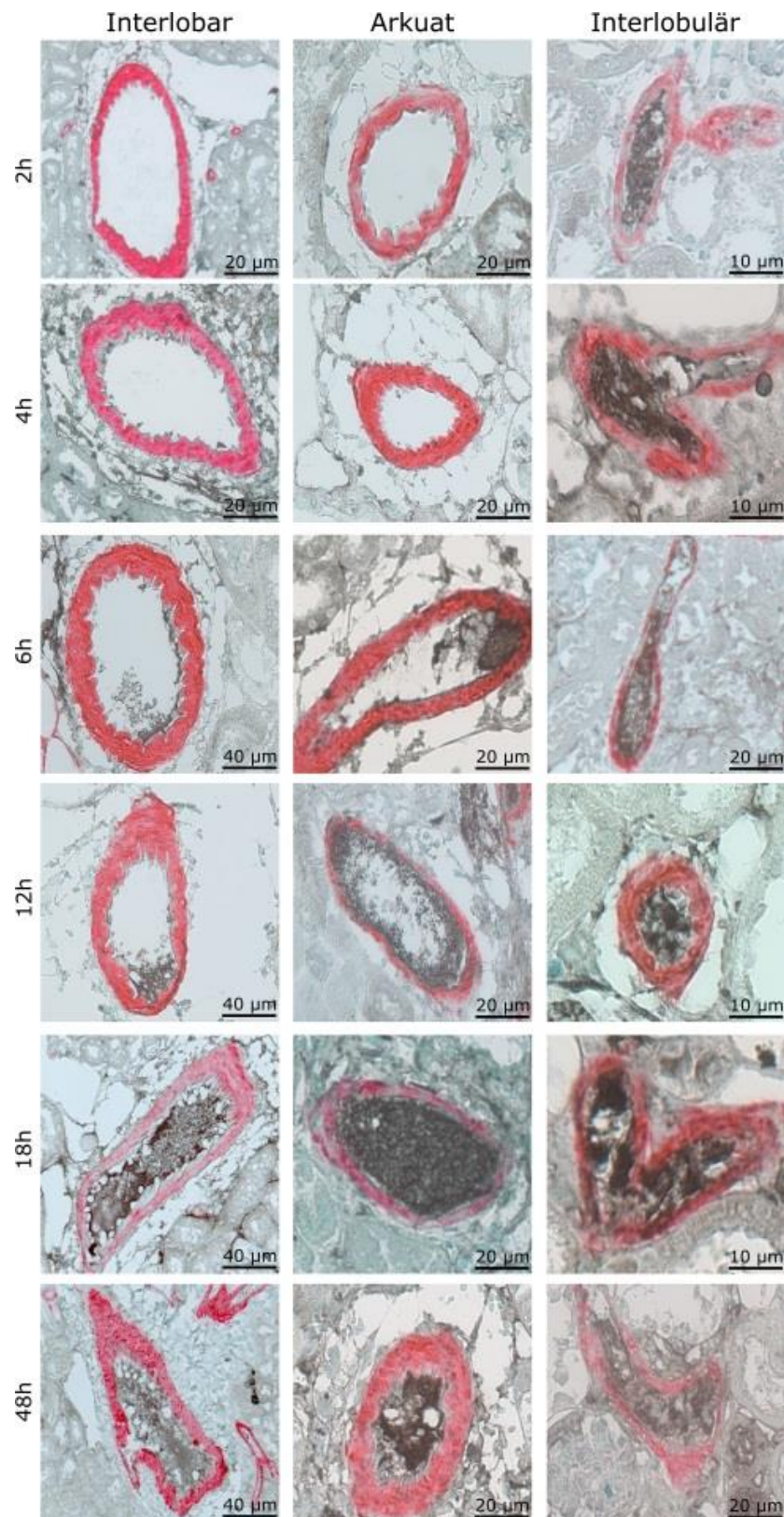


Abbildung 18: Dynamik der Thrombusbildung nach CCE (repräsentative Bilder) Repräsentative Darstellung von Obstruktionen in den verschiedenen Nierenarterien für die jeweiligen Zeitpunkte nach CC-Injektion. Es zeigt sich das Bild einer fortschreitenden thrombotischen Angiopathie.

Um einen effektiven Therapieeinsatz zu ermöglichen, sollte die Plasminogenbehandlung zu dem Zeitpunkt erfolgen, zu dem die Gefäßobstruktionen noch reversibel sind, um einen kompletten Ausfall der Nierenfunktion zu verhindern. Ein Therapiebeginn vor einer Ausbreitung der Thrombosen in die interlobaren Arterien wäre in diesem Sinn vorteilhaft. Übermäßige Verschlüsse der interlobulären Arterien sollten idealerweise verhindert werden, weil diese Arterien eine wichtige Rolle für die glomeruläre Perfusion spielen. Angesichts des zeitlichen Verlaufs der Obstruktionen in den interlobulären Arterien wurde eine Therapieeinleitung spätestens 4 h nach CCE-Beginn als optimal beurteilt. Daraus ergaben sich grundsätzlich zwei Fragen, die in folgenden Teilstudien beantwortet werden mussten, nämlich:

1. Ob die nach 4 h post-CC-Injektion bestehenden Obstruktionen in den interlobulären Arterien durch eine Plasminogengabe noch reversibel wären
2. Ob eine Ausbreitung der Thrombosen in die arkuaten und interlobaren Gefäßen durch Plasminogengabe vermieden sein kann

5.1.2 Zeitverlauf der CCE-induzierten akuten Nierenschädigung

Die der Cholesterinkristalle exponierte Niere zeichnete sich 48 h nach CCE-Induktion im Vergleich zur kontralateralen Niere durch Schwellung und Diskolorationen aus, die als Zeichen eines territorialen Infarkts angenommen sein können (**Abb.19**).

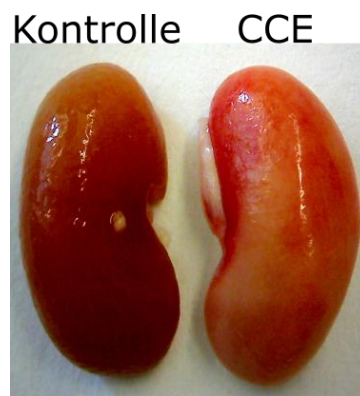


Abbildung 19: Makroskopische Aufnahme von einer durch CCE betroffenen Niere. Die durch CCE betroffene Niere (rechts) weist im Vergleich zur gesunden Kontrollniere (links) deutliche makroskopische Unterschiede auf.

Eine histologische Untersuchung kann wichtige Informationen über den zeitlichen Verlauf der durch CC-provozierten Nierenschädigung liefern. Durch Analyse der betroffenen Nieren mit Hilfe der PAS-Reaktion ließen sich verschiedene morphologische Merkmale der akuten Nierenschädigung erkennen.

Im Zeitraum von 2 h bis 6 h nach der CCE haben sich in der betroffenen Niere keine bis nur geringe strukturelle Änderungen im Vergleich zur gesunden Niere gezeigt (**Abb. 20,21**). Wenn vorhanden, bestanden diese pathologischen Veränderungen hauptsächlich im Verlust vom Bürstensaum in bestimmten Arealen. Nach 12 h waren die ersten Zeichen von kortikalen und medullären Nekrosen, sowie Tubulusdilatationen sichtbar, begleitet von vermehrt auftretenden Nierenzylindern. Die Schäden waren in den späteren Zeitpunkten noch stärker ausgeprägt. 18 h nach CC-Injektion traten in den meisten Nieren zusätzlich interstitielle ödematöse Veränderungen auf, die sich nach 48 h noch deutlicher zeigten (**Abb. 21**).

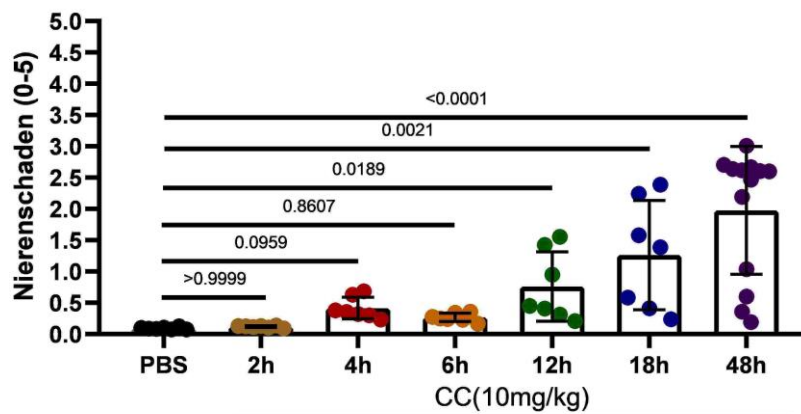


Abbildung 20: Zeitverlauf des Nierenschadens nach CCE (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der histologischen Merkmale des Nierenschadens nach CCE. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar.

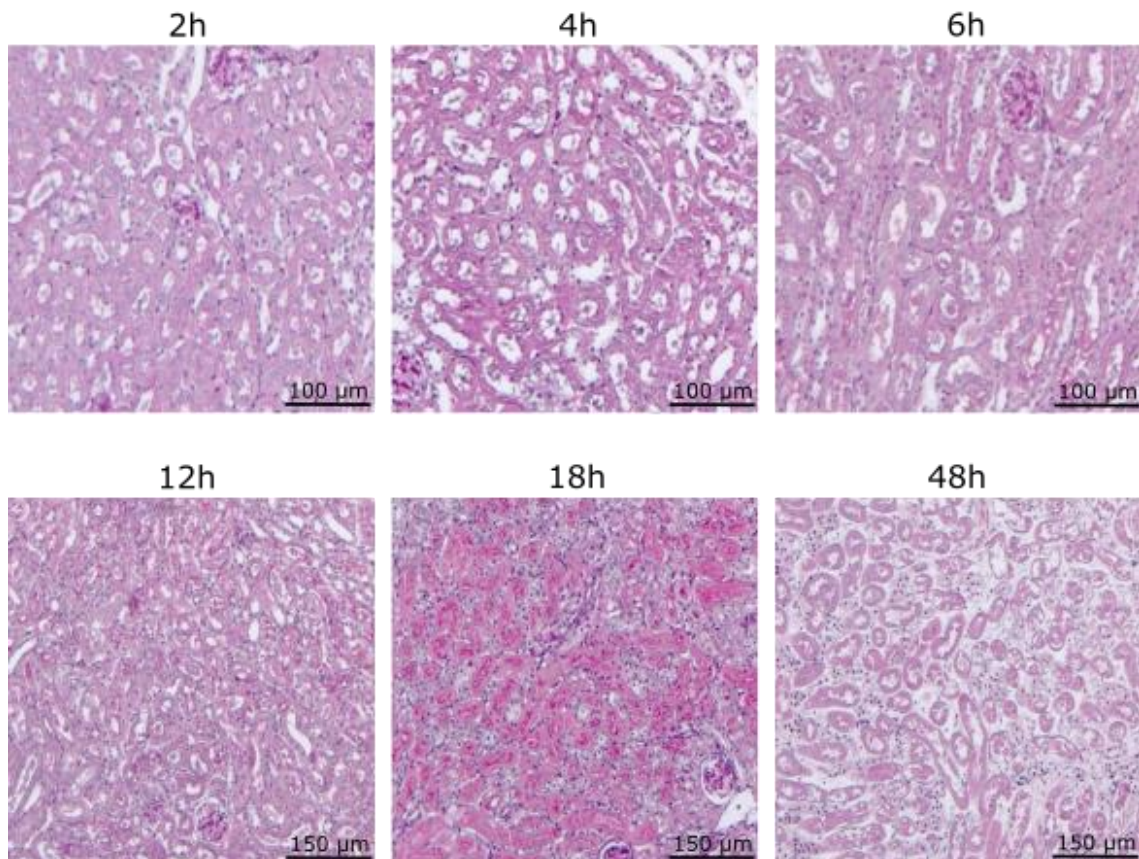


Abbildung 21: Zeitverlauf des Nierenschadens nach CCE (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der Nieren für die jeweiligen Zeitpunkte nach der CC-Injektion. Es zeigen sich progrediente Zeichen von Tubulusnekrose und einem Parenchymödem ab dem 12 h-Zeitpunkt.

Die Evaluation von Nierenschnitten mittels der CD31-Färbung für endotheliale Zellen ergab ein ähnliches Ergebnis über die verschiedenen Zeitpunkte. Die Zeitpunkte 2 h, 4 h, und 6 h zeichneten sich durch keinen oder nur einen geringen Verlust an endothelialen Zellen im Vergleich zu der gesunden Kontrolle aus (**Abb. 22A,B**). Die ersten signifikanten Verluste an CD31+ Mikrovaskulatur ließen sich erst 12 h nach dem CCE-auslösenden Eingriff feststellen. Zu den späteren Zeitpunkten hatten die Schäden an den Endothelzellen noch deutlicher zugenommen, wobei nach 48 h einige betroffene Nieren einen fast kompletten Mikrovaskulaturverlust im Vergleich zur gesunden Kontrolle erlitten hatten (**Abb. 22B**).

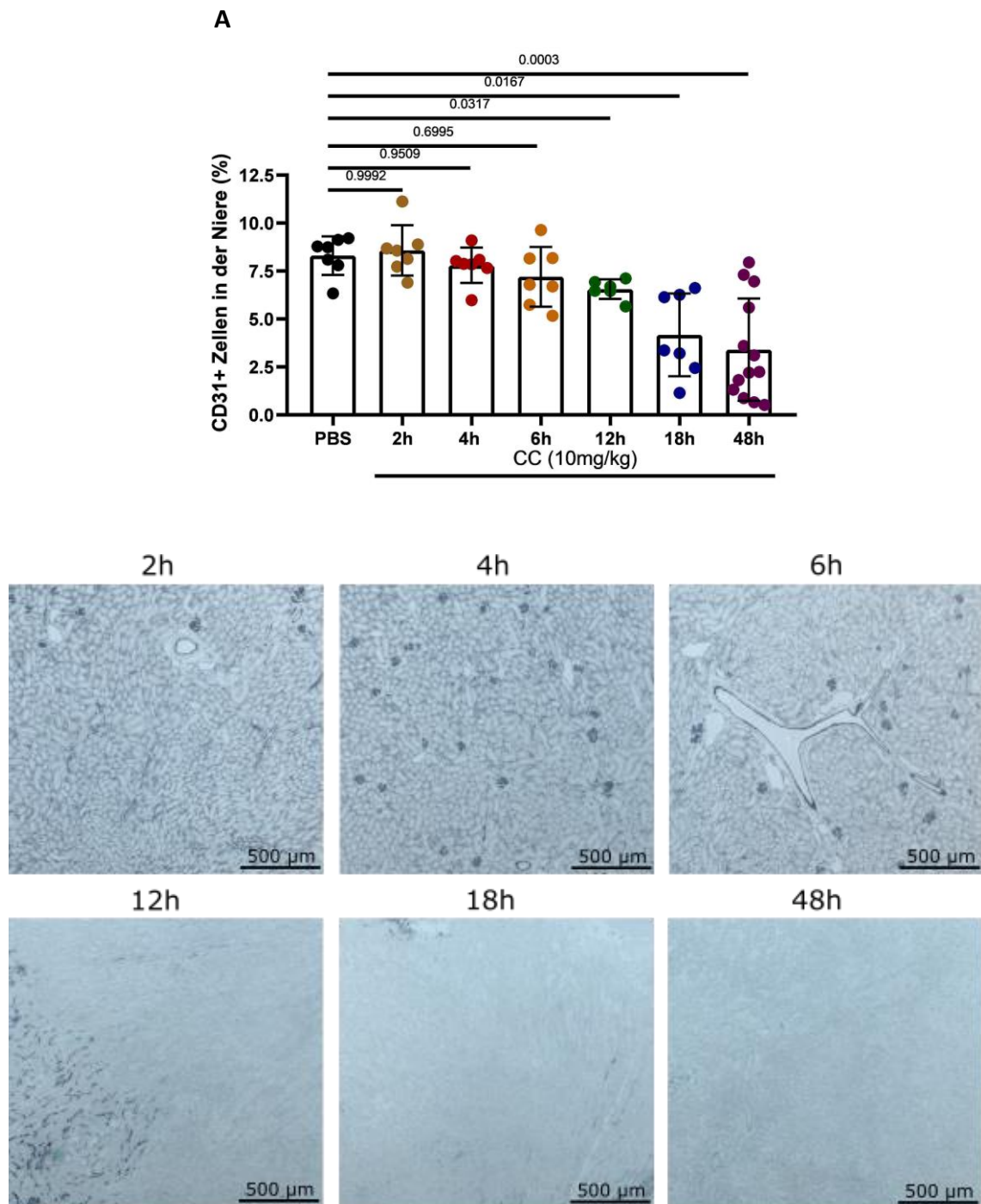


Abbildung 22: Verlust der CD31+ Mikrovaskulatur infolge von CCE. A: Semiquantitative Analyse der CD31-Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Zeitpunkte nach der CC-Injektion. Es zeigt sich ein progredienter Verlust von CD31+ Zellen ab dem 12 h-Zeitpunkt

Eine vermehrte Neutrophileninfiltration tritt meistens infolge von entzündlichen Prozessen auf. Um den inflammatorischen Verlauf in der Niere nach CCE besser zu verstehen, wurde die Neutrophileninfiltration in der Niere mittels der Anti-Ly6B+ Färbung dargestellt. Hierbei war eine Neutrophileninfiltration zu den 2 h, 4 h und 6 h Zeitpunkten kaum nachweisbar. Klare Zeichen einer Neutrophileninfiltration waren in einigen Nieren erst nach 12 h, in den meisten Fällen jedoch erst 48 h nach der CC-Injektion vorhanden (**Abb. 23, 24**). Das Vorhandensein von Neutrophilen war in der Regel um die irregulären Ränder der Territorialinfarkte sichtbar (**Abb. 24**). Diese inflammatorische Reaktion ähnelt dem Verlauf in anderen Organen, wie z.B. nach Myokardinfarkt oder ischämischem Schlaganfall (102,152-154). Es ist aber auch nennenswert, dass in einzelnen Nieren keine Infiltration sogar zum 48 h-Zeitpunkt zu beobachten war (**Abb. 23**). Die Entwicklung im Zeitverlauf deutete auf eine progressive Zunahme der Neutrophileninfiltration zwischen 12 h und 48 h nach CCE-Induktion hin (**Abb. 24**). Dadurch ließ sich die der Zusammenhang zwischen CCE und der progredienten periläsionären Neutrophiliennfiltration in der Niere nachweisen.

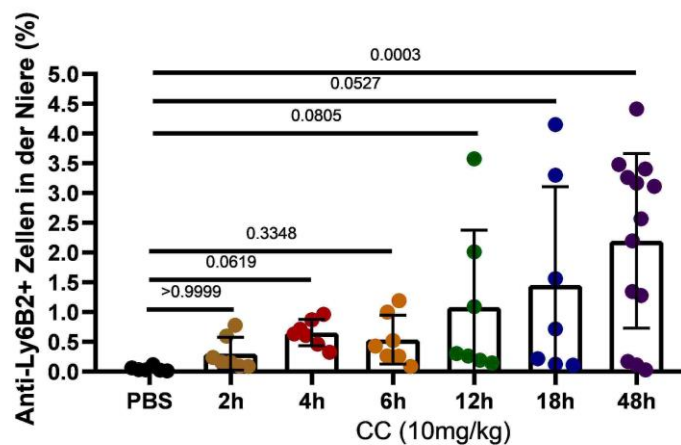


Abbildung 23: Zeitdynamik der Neutrophileninfiltration nach CCE (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der Anti-Ly6B-Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar.

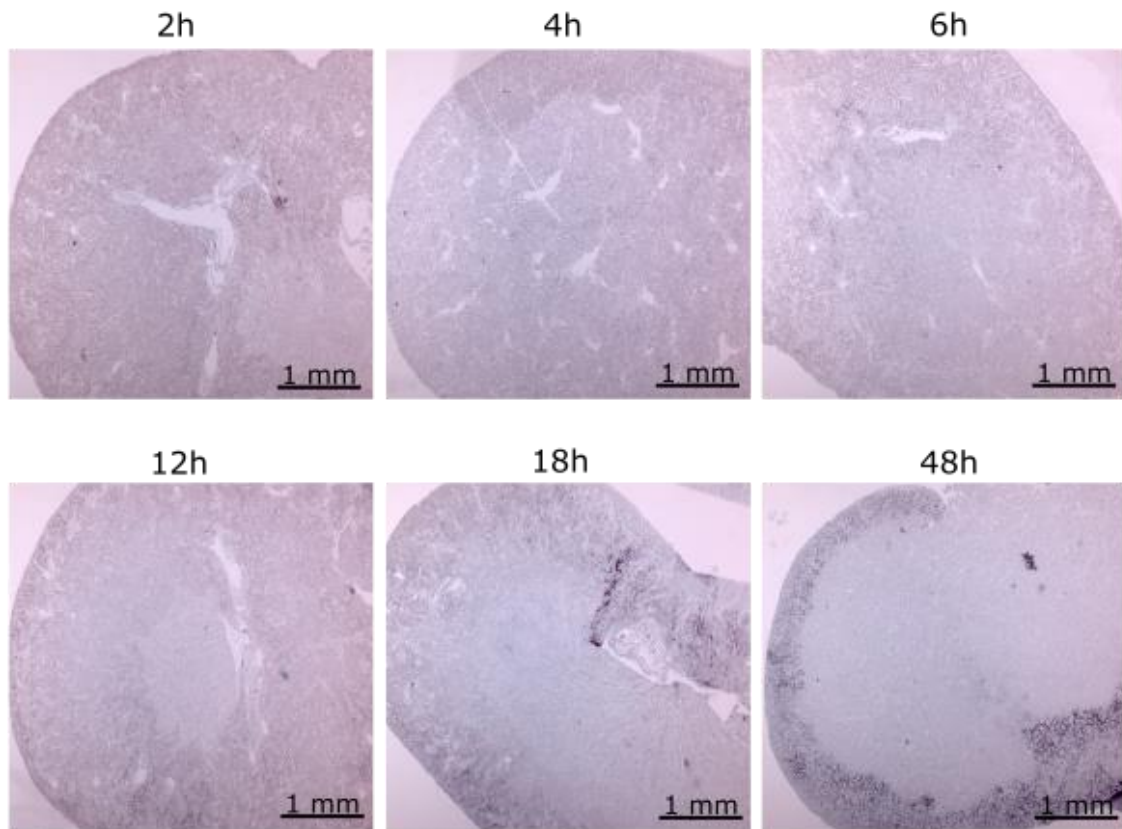


Abbildung 24: Zeitdynamik der Neutrophileninfiltration nach CCE (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der Nieren für die jeweiligen Zeitpunkte nach der CC-Injektion. Es lassen sich Zeichen einer peripheren Neutrophileninfiltration zum 48 h-Zeitpunkt nachweisen.

5.2 Thrombolytische Wirkung vom Glu-Plasminogen

In der zweiten Teilstudie wurde der dosisabhängige thrombolytische Effekt vom humanen und murinen Glu-Plasminogen untersucht. Das optimale Therapiefenster wurde basierend auf den Ergebnissen der ersten Teilstudie als innerhalb von 4 h nach dem CCE-Beginn definiert. Den Versuchstieren in der zweiten Teilstudie wurde dementsprechend nach der CC-Injektion jeweils Glu-PLG, Lys-PLG oder PBS-Kontrolllösung intravenös verabreicht. Während der Experimente wurden auch im Höchstdosisbereich keine Blutungskomplikationen nachgewiesen.

5.2.1 Humanes Glu-Plasminogen

Humanes Glu-Plasminogen wurde in 6 verschiedenen Konzentrationen verabreicht und seine Auswirkungen auf die Nierenfunktion und Thrombolyse 24 h nach der CC-Injektion analysiert.

Nach Behandlung mit humanem Glu-PLG wurde in den Mäusen eine Wiederherstellung der Nierenfunktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren beobachtet (**Abb.25**). Eine Verbesserung der Nierenfunktion war lediglich im Höchstdosisbereich (1,5 mg/kg) statistisch signifikant. Dadurch ließ sich der positive dosisabhängige Effekt vom humanen Glu-PLG auf die Nierenfunktion nachweisen.

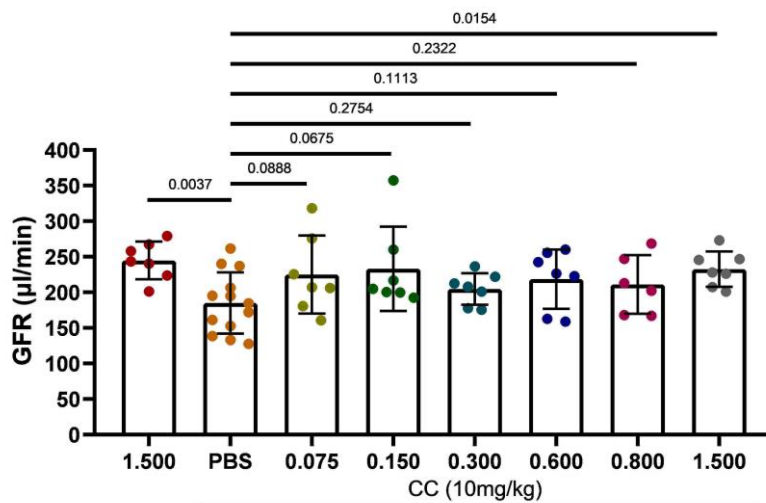


Abbildung 25: Dosisabhängige Auswirkung vom Hu Glu-PLG auf die GFR 24 h nach CCE. Quantitative Analyse der GFR nach der Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Messungen ± SEM dar. Ein statistisch signifikanter GFR-Abfall infolge von CCE ist nach 24 h nachweisbar. Eine dosisabhängige Verbesserung der GFR nach PLG-Behandlung konnte nach 24 h bestimmt werden. Dargestellt sind Konzentrationen vom humanen Glu-PLG in mg/kg.

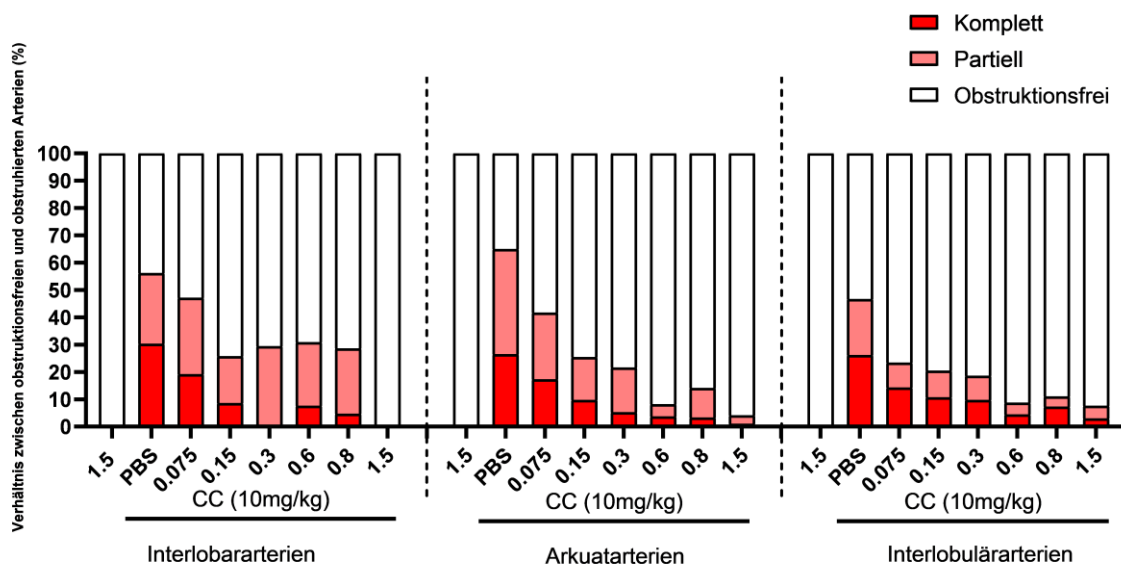


Abbildung 26: Thrombolytische Wirkung vom humanen Glu-PLG (graphische Darstellung). Semiquantitative Bestimmung des arteriellen Obstruktionsgrads. Partielle und komplette Obstruktionen sind im Verhältnis zu den obstruktionsfreien Gefäßen dargestellt. Dargestellt sind Konzentrationen vom humanen Glu-PLG in mg/kg.

Bei der Untersuchung der thrombolytischen Effektivität vom humanen Glu-PLG war ebenso eine Reduktion der Zahl von arteriellen Obstruktionen nachweisbar (**Abb. 26**). Die Behandlung mit humanem Glu-PLG 4h postinterventionell ergab einen dosisabhängigen Effekt auf die arteriellen Obstruktionen. Hierbei konnte mit Erhöhung der Plasminogendosis eine progrediente Reduktion der Zahl der Gefäßobstruktionen erreicht werden. Humanes Glu-PLG konnte in der betroffenen Niere im Höchstdosisbereich (1,5 mg/kg) einen nahezu vollständigen Schutz vor arteriellen Thrombosen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollnieren leisten (**Abb. 27**). Dieser Effekt war in allen Arteriengrößen zu beobachten und betraf sowohl die partiellen, als auch die kompletten Obstruktionen. Dies veranschaulichte das thrombolytische Potenzial vom humanen Glu-Plasminogen.

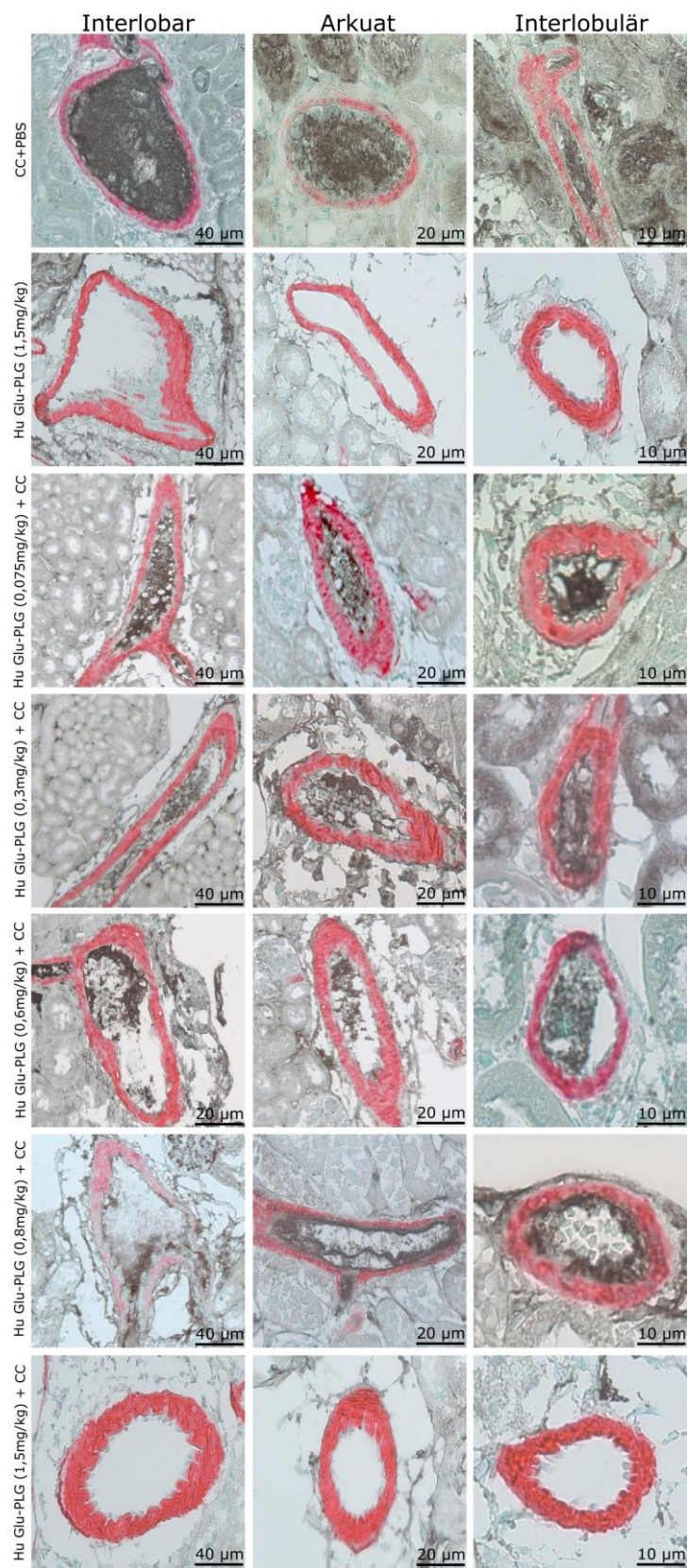


Abbildung 27: Thrombolytische Wirkung vom humanen Glu-PLG (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Obstruktionen in den verschiedenen Nierenarterien für die jeweiligen Konzentrationen vom humanen Glu-Plasminogen.

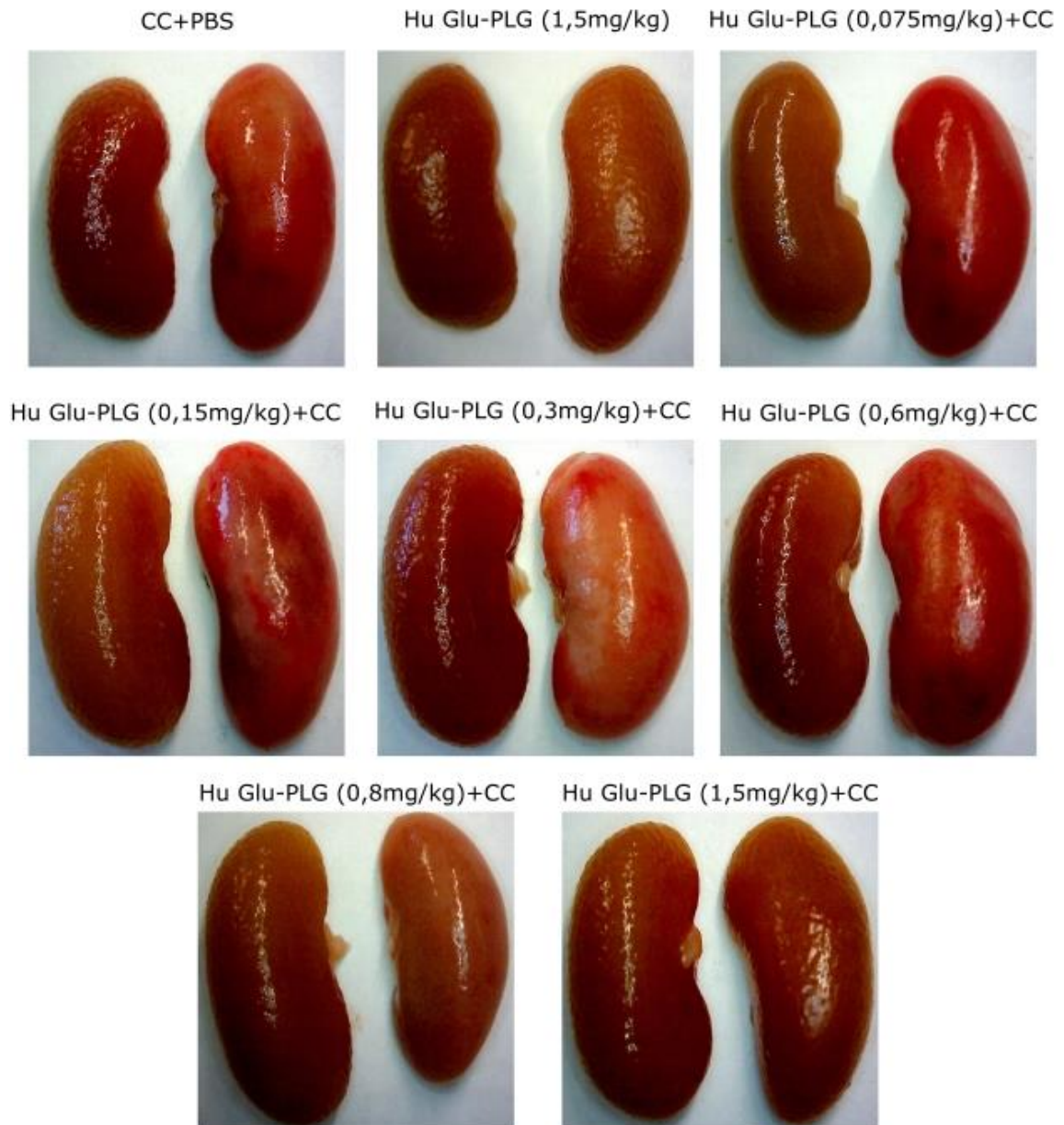


Abbildung 28: Makroskopische Nierenaufnahmen (Hu Glu-Plasminogen). Auf der rechten Seite der jeweiligen Aufnahmen sind die mit CC-behandelten Nieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollnieren (linke Seite) dargestellt. Dabei ist dosisabhängiger Rückgang der makroskopischen Ischämiezeichen ersichtlich.

Eine makroskopische Untersuchung der mit humanem Glu-Plasminogen behandelten Nieren ergab eine dosisabhängige Reduktion von Diskolorationen und Nierenschwellung, insbesondere in der 1,5 mg/kg Dosis (**Abb. 28**).

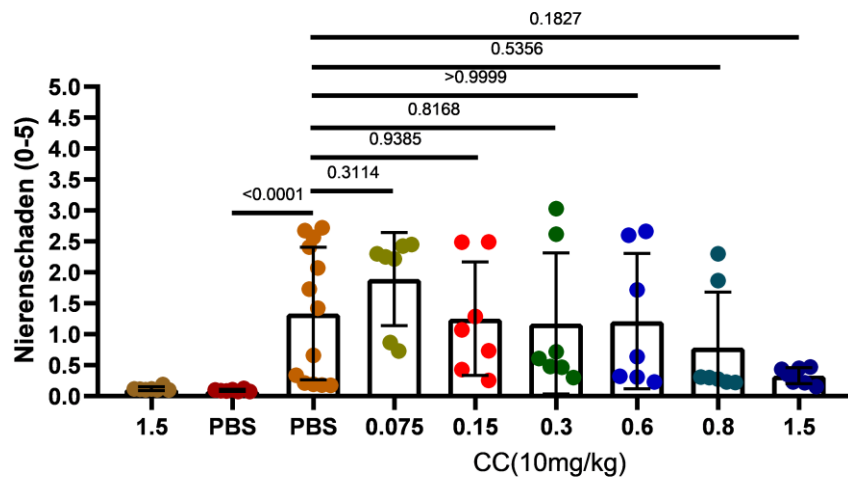


Abbildung 29: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der histologischen Merkmale des Nierenschadens nach CCE. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. Dargestellt sind Konzentrationen vom humanen Glu-PLG in mg/kg.

Im Gegenteil zu den Befunden, die bei der Auswertung der Gefäßobstruktionen erhoben wurden, zeigte die Behandlung mit humanem Glu-Plasminogen einen weniger ausgeprägten Effekt bei der Prävention von CCE-bedingten Tubulusnekrosen und Ödemen. Bei der Beurteilung von strukturellen Schäden mittels der PAS-Reaktion zeigte humanes Glu-PLG in höheren Konzentrationen in einzelnen Nieren einen protektiven Effekt gegen ischämische Schäden, dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant (**Abb. 29**). In der 1,5 mg/kg Gruppe ließen sich mikroskopisch in keiner Niere ausgeprägte interstitielle Ödeme oder Tubulusnekrosen beobachten (**Abb. 30**).

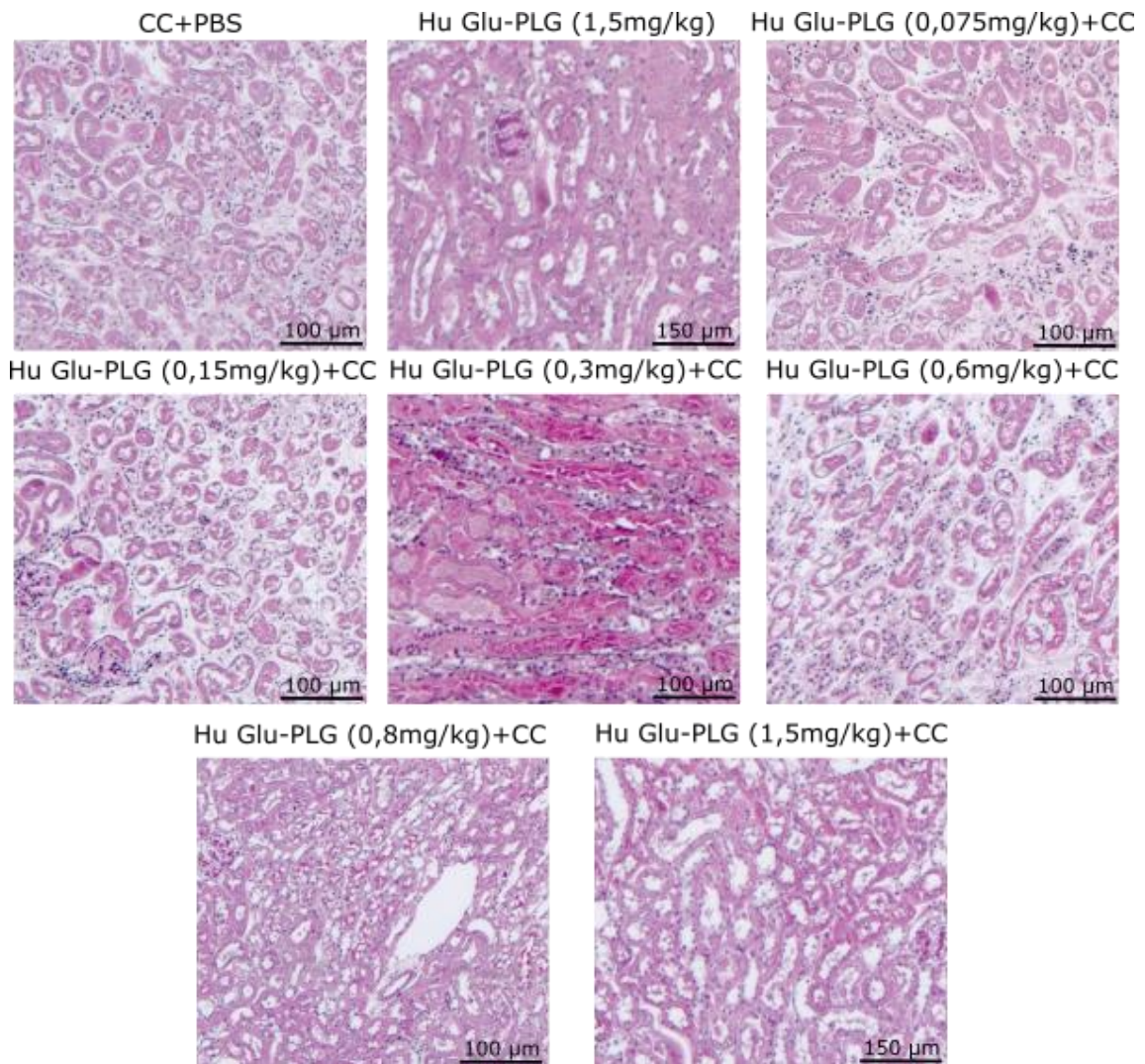


Abbildung 30: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden (Repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Nieren nach Behandlung mit den jeweiligen Hu Glu-PLG-Konzentrationen. Es konnte keine dosisabhängige Wirkung vom Hu Glu-PLG auf CCE-bedingte Nierenschäden demonstriert werden.

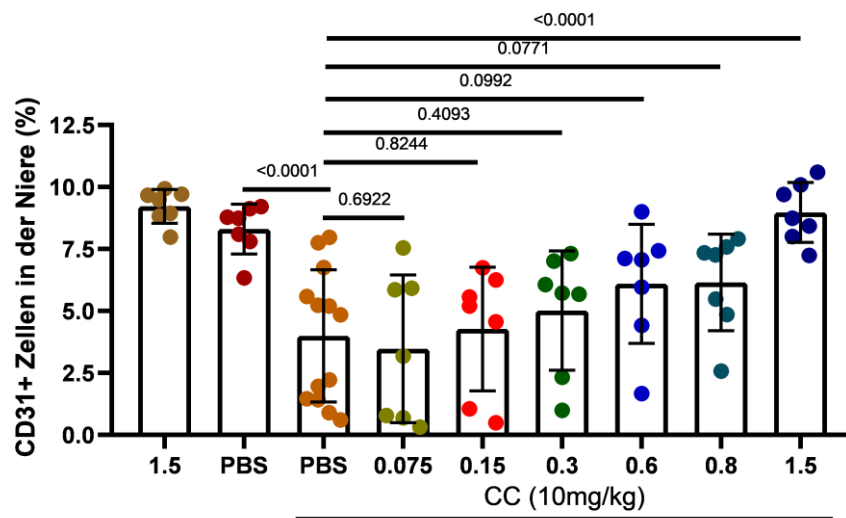


Abbildung 31: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der CD31-Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. Dargestellt sind Konzentrationen vom humanen Glu-PLG in mg/kg.

Die Untersuchung von CD31+ Endothelzellen ergab eine konzentrationsabhängige protektive Wirkung auf die Mikrovaskulatur (**Abb. 31**). Diese Auswirkung war allerdings lediglich für die 1,5 mg/kg Gruppe statistisch signifikant. Mikroskopisch ließen sich in den mit dieser Dosis behandelten Nieren 24h nach der CC-Injektion keine Arealen nekrotischer Endothelzellen nachweisen. Dies deutet auf einen kompletten Schutz der Mikrovaskulatur in der 1,5 mg/kg Hu Glu-PLG Gruppe (**Abb. 32**). Zusammenfassend konnte anhand der Ergebnisse die protektive Wirkung vom Hu Glu-PLG auf die Mikrovaskulatur veranschaulicht werden.

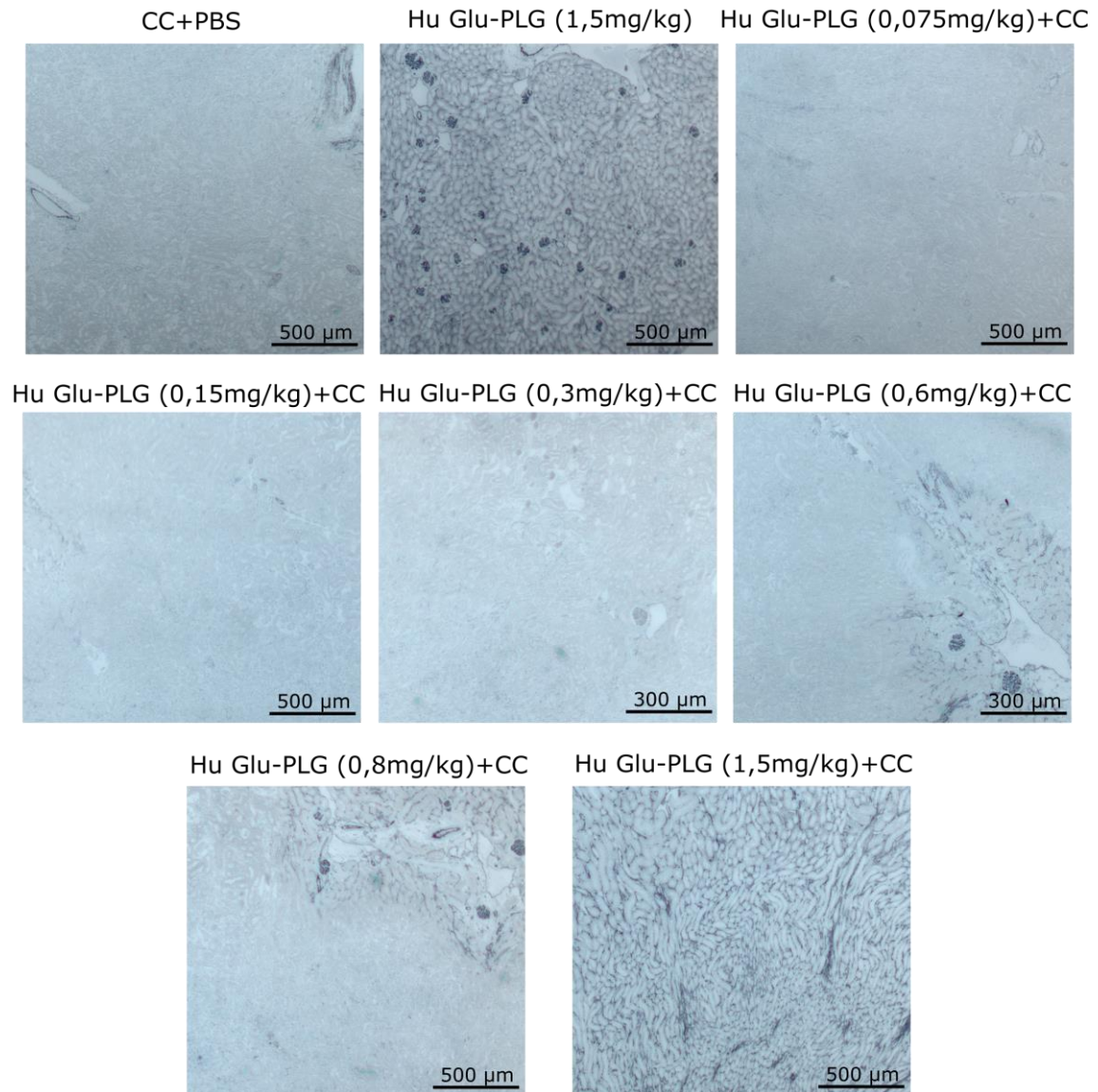


Abbildung 32: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust (Repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der Nieren nach Behandlung mit den jeweiligen Hu Glu-PLG-Konzentrationen. Es zeigt sich ein dosisabhängiger Rückgang der Nekrose von CD31+ Endothelzellen.

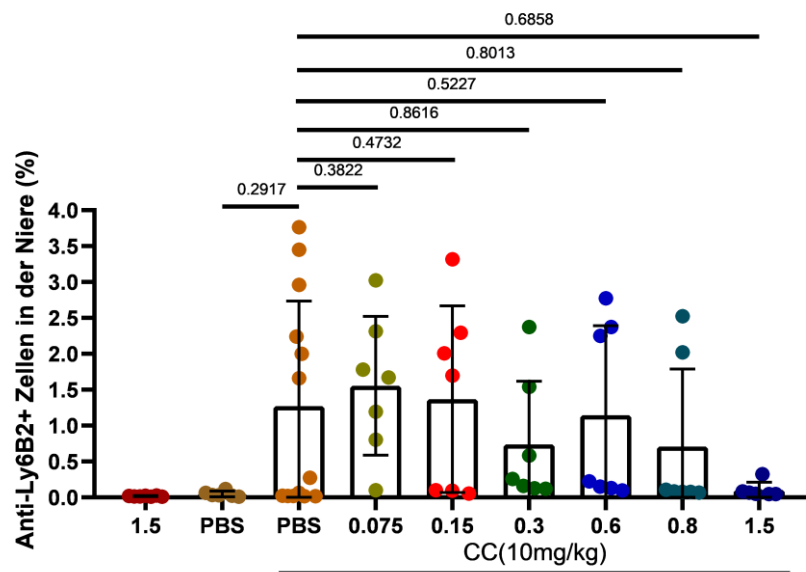


Abbildung 33: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der Anti-Ly6B-Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. Dargestellt sind Konzentrationen vom humanen Glu-PLG in mg/kg.

Die Auswertung der Neutrophileninfiltration in das Nierenparenchym zeigte keine eindeutigen Ergebnisse. Obwohl nach Behandlung mit der 1,5 mg/kg Hu Glu-PLG-Dosis in den Nieren keine Bereiche mit ausgeprägter Neutrophileninfiltration mikroskopisch beobachtet wurden, konnte hierbei kein statistisch signifikanter Effekt bestätigt werden (**Abb. 33**). Allerdings zeigte auch hier die 1,5 mg/kg Dosis die stärkste Wirkung, wobei z.B. nach Behandlung mit der 0,075 mg/kg Dosis in fast allen untersuchten Nieren eine deutliche Infiltration von Neutrophilen ins Nierenparenchym nachgewiesen wurde (**Abb. 34**).

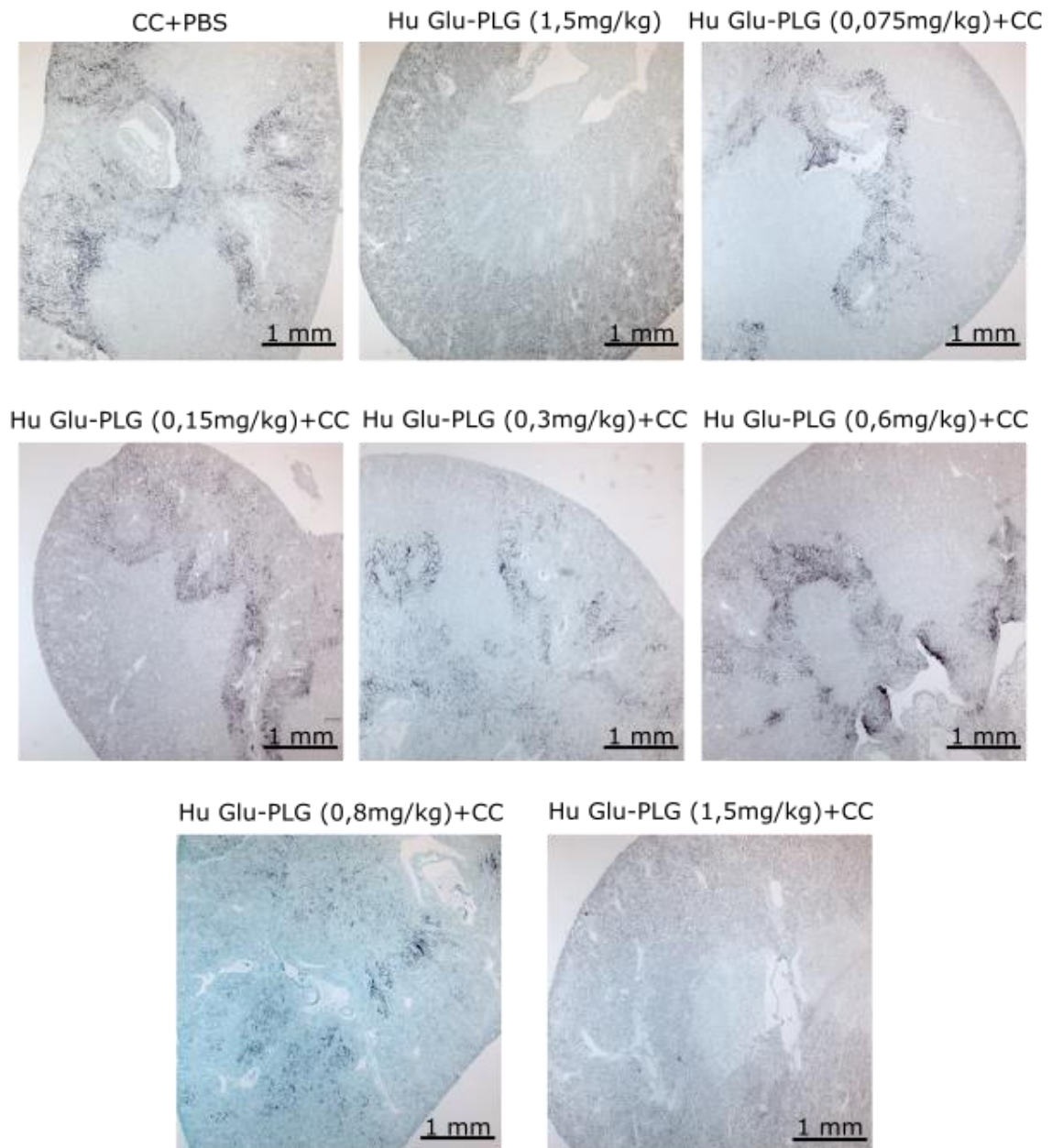


Abbildung 34: Effekt vom humanen Glu-Plasminogen auf CCE-bedigte Neutrophileninfiltration (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Nieren nach Behandlung mit den jeweiligen Hu Glu-PLG-Konzentrationen. Es konnte kein dosisabhängiger Effekt auf die Neutrophileninfiltration nach CCE etabliert werden.

5.2.2 Murines Glu-Plasminogen

In der zweiten Teilstudie erfolgte zusätzlich die Untersuchung vom murinen Glu-PLG. Dieses wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen jeweils 4 h nach der CC-Injektion

intravenös verabreicht. Die GFR-Messung und Organentnahme wurden 24 h nach CCE-Auslösung durchgeführt.

Im Unterschied zum humanen Glu-PLG konnte nach Behandlung mit murinem Glu-PLG keine Besserung der GFR nach 24 h festgestellt werden (**Abb. 35**). Ein Schutz vor GFR-Abfall nach 24 h konnte auch im höheren Dosisbereich nicht gewährleistet werden. Es zeigte sich hierbei keine signifikante Verbesserung der GFR im Vergleich zu nicht den nicht behandelten Kontrollgruppen.

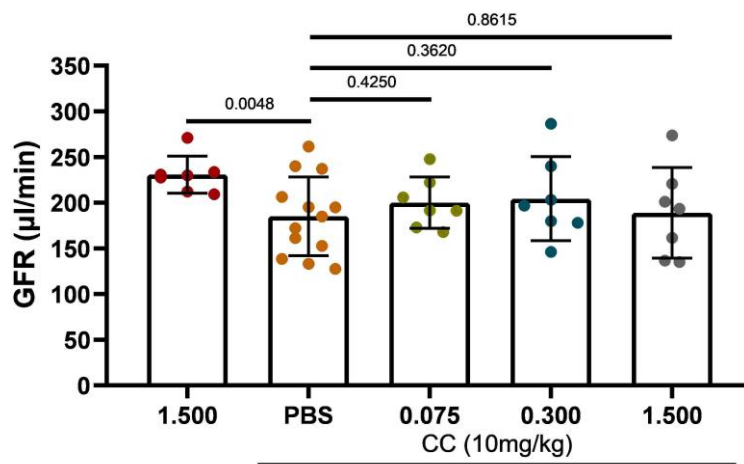


Abbildung 35: Auswirkung vom murinen Glu-PLG auf die GFR 24 h nach CCE Quantitative Analyse der GFR nach der beschriebenen Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Messungen \pm SEM dar. Ein statistisch signifikanter GFR-Abfall infolge von CCE ist nach 24 h nachweisbar. Eine Verbesserung der GFR blieb nach Applikation vom Mu Glu-PLG 4 h postinterventionell aus. Dargestellt sind Konzentrationen vom murinen Glu-PLG in mg/kg.

Bei der Bestimmung der Zahl von arteriellen Obstruktionen wurde ebenso keine protektive Wirkung vom murinen Glu-PLG beobachtet. Die Zahl der kompletten und partiellen Obstruktionen konnte durch den Einsatz vom murinen Glu-PLG nicht signifikant reduziert werden (**Abb. 36**).

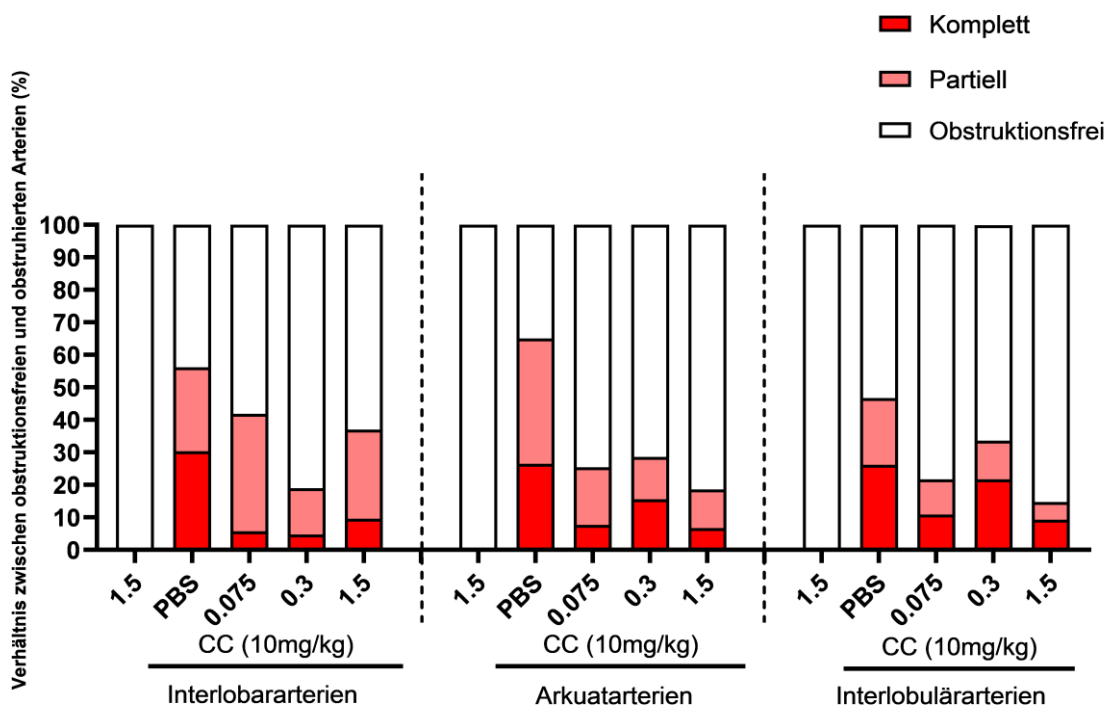


Abbildung 36: Thrombolytische Wirkung vom murinen Glu-Plasminogen (graphische Darstellung). Semiquantitative Bestimmung des arteriellen Obstruktionsgrads. Partielle und komplette Obstruktionen sind im Verhältnis zu den obstruktionsfreien Gefäßen dargestellt. Dargestellt sind Konzentrationen vom murinen Glu-PLG in mg/kg.

Bei der Bestimmung der Zahl von arteriellen Obstruktionen wurde keine protektive Wirkung vom murinen Glu-PLG nachgewiesen. Obwohl die Zahl der Gefäßobstruktionen bei allen behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe abgenommen hatte, wurde im Gegensatz zu der Behandlung mit humanem Glu-PLG keinen klaren dosisabhängigen Effekt beobachtet (**Abb. 36**). Die arteriellen Obstruktionen persistierten auch in der 1,5 mg/kg Therapiegruppe (**Abb. 37**), was für eine geringere thrombolytische Effektivität vom murinen Glu-PLG im Vergleich zum humanen Glu-PLG-Medikament sprechen könnte.

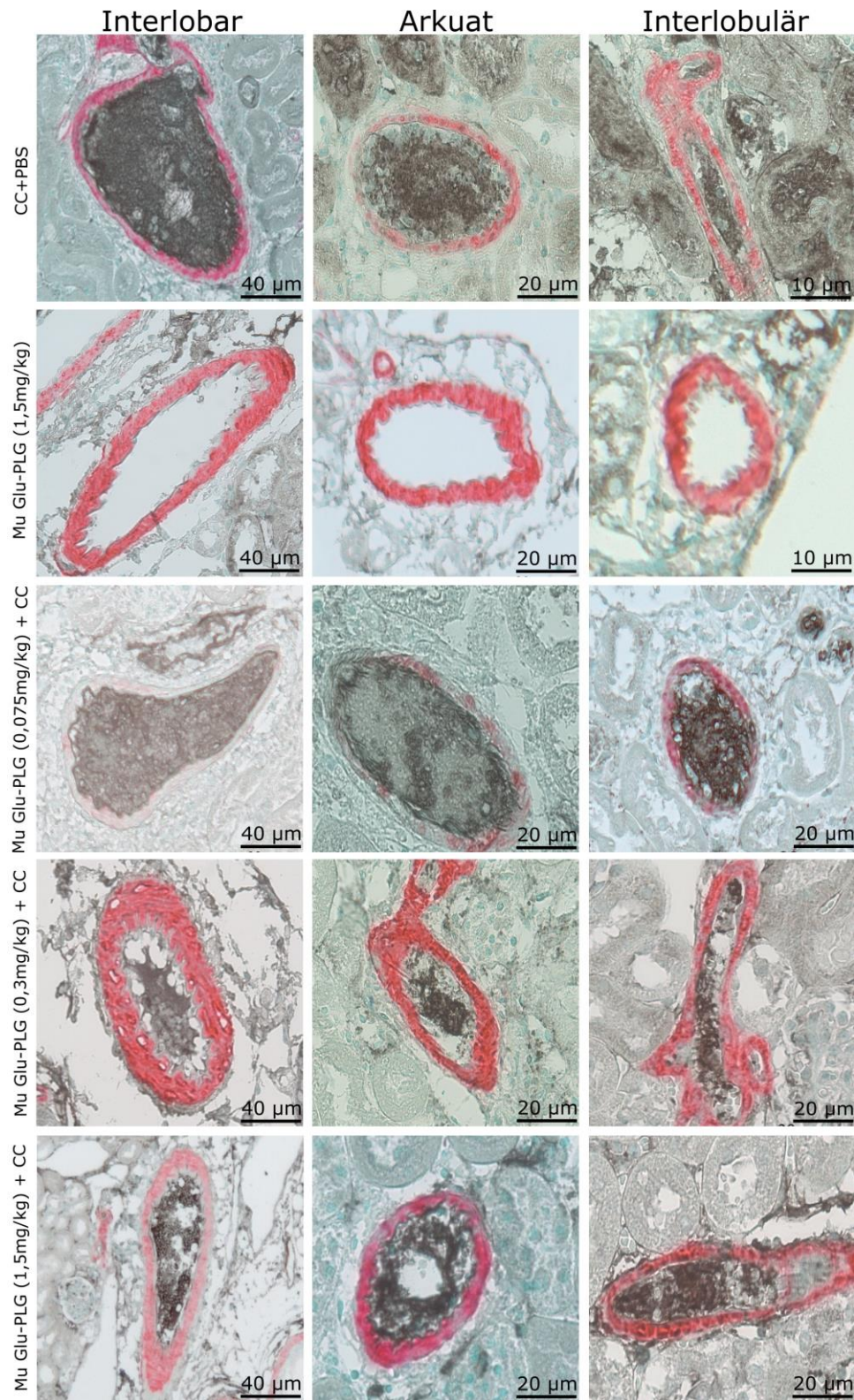


Abbildung 37: Thrombolytische Wirkung vom murinen Glu-Plasminogen (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Obstruktionen in den verschiedenen Nierenarterien für die verschiedenen Konzentrationen vom murinen Glu-Plasminogen zum 24h-Zeitpunkt.

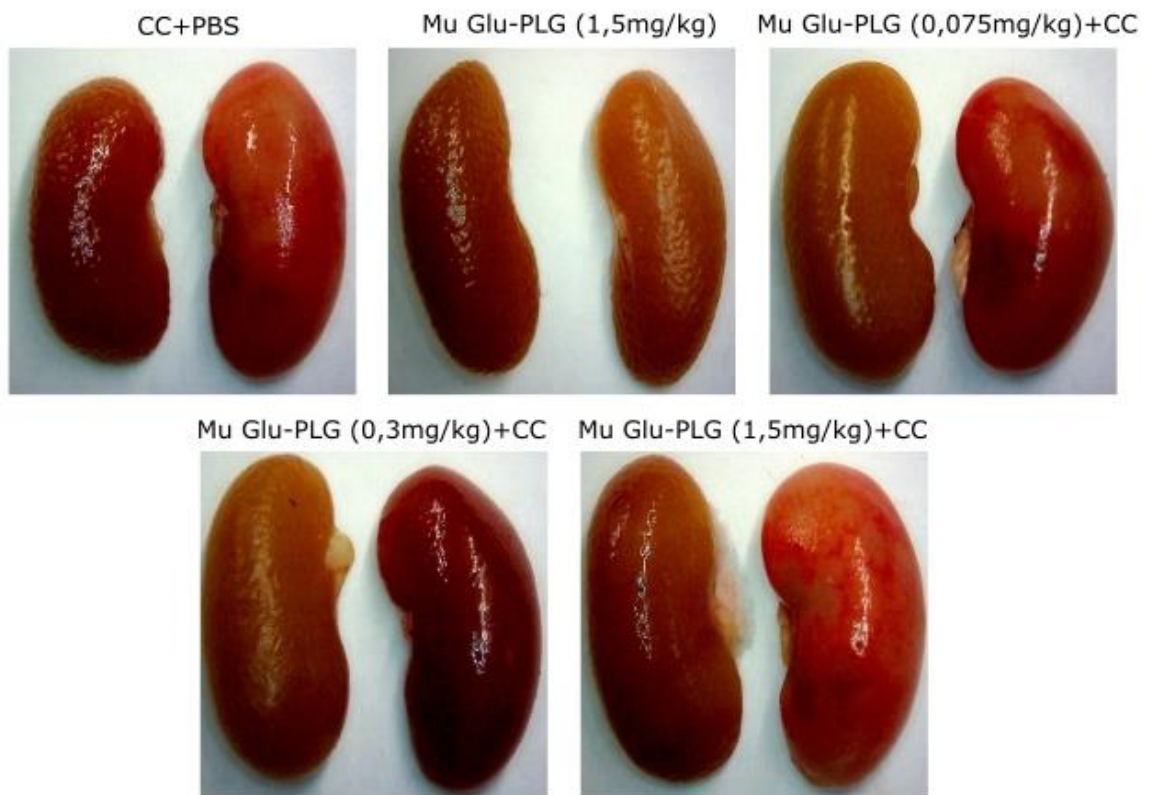


Abbildung 38: Makroskopische Nierenaufnahmen (Mu Glu-Plasminogen). Auf der rechten Seite der jeweiligen Aufnahmen sind die mit CC-behandelten Nieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollnieren (links) dargestellt. Dabei ist kein dosisabhängiger Rückgang der makroskopischen Ischämiezeichen ersichtlich.

Eine makroskopische Untersuchung der mit murinen Glu-Plasminogen behandelten Nieren ergab keine dosisabhängige Reduktion von Diskolorationen und Nierenschwellung für die verschiedenen applizierten Konzentrationen zum 24h-Zeitpunkt (**Abb. 38**).

Die Analyse der Nieren mit Hilfe der PAS-Reaktion ergab für die Behandlung mit murinem Glu-PLG keinen signifikanten Schutz vor ischämischen Schäden 24 h nach der CC-Injektion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (**Abb. 39**).

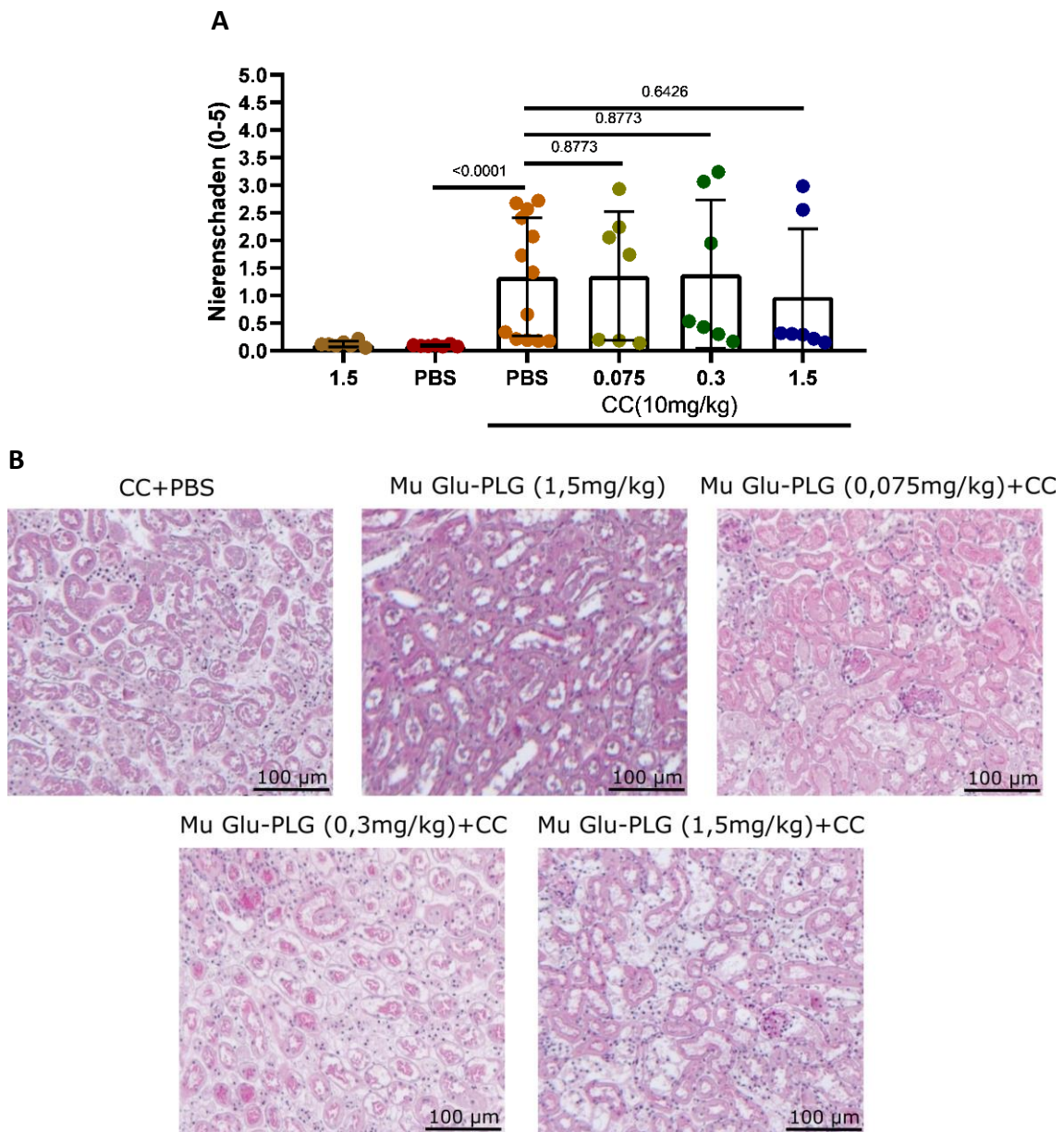


Abbildung 39: Effekt vom murinen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden A: Semiquantitative Analyse der histologischen Merkmale des Nierenschadens nach CCE. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Mu Glu-PLG-Konzentrationen. Es konnte keine dosisabhängige Wirkung vom Mu Glu-PLG auf Nierenschaden demonstriert werden.

Der Einfluss auf die CD31+ Mikrovaskulatur war weniger eindeutig, wobei im Höchstdosisbereich einige Tiere auf die Behandlung mit murinem Glu-pLG positiv reagierten und in den untersuchten Nieren einen relativen Erhalt der CD31-positiven Zellen zeigten (**Abb. 40B**). Allerdings konnte dieser Effekt nicht als statistisch signifikant bewertet werden (**Abb. 40A**).

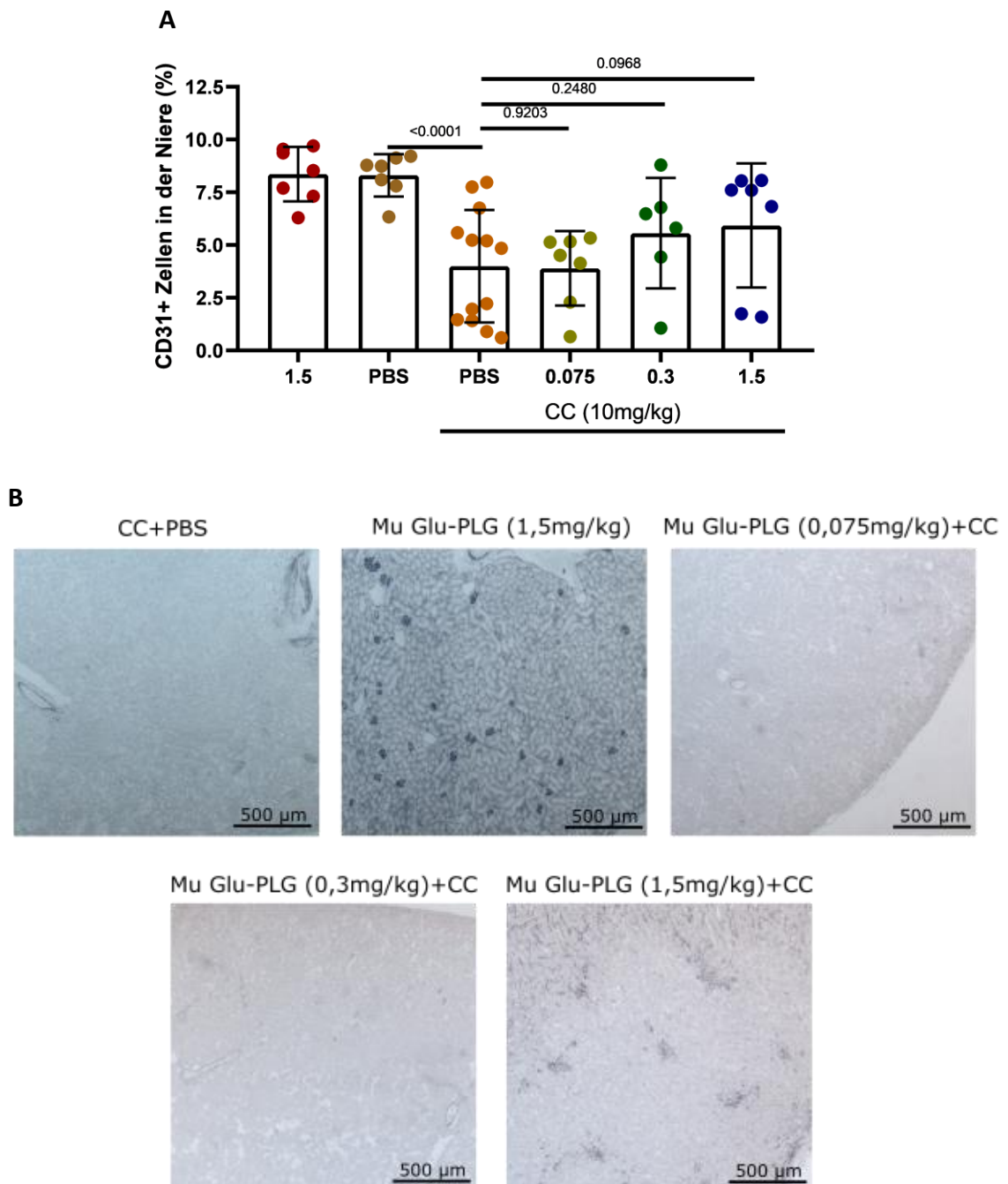


Abbildung 40: Effekt vom murinen Glu-Plasminogen auf CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust. A: Semiquantitative Analyse der CD31-Färbung. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Mu Glu-PLG-Konzentrationen. Es zeigt sich kein protektiver Effekt vom Mu Glu-PLG auf CD31+ Endothelzellen

Ähnlich zu den Ergebnissen von anderen immunhistologischen Analysen konnte nach Behandlung mit murinem Glu-PLG auch im Höchstdosisbereich keine signifikante Reduktion der periläsionären Neutrophileninfiltration erreicht werden (**Abb. 41**).

Dosisabhängigkeit der thrombolytischen Wirkung etabliert werden. Humanes Glu-PLG zeigte sich in diesem Tiermodell als thrombolytisch effektiver im Vergleich zum murinen Glu-PLG. Schlussfolgernd wurde entschieden, die Wirkung vom humanen Glu-PLG in den folgenden Teilstudien näher zu untersuchen.

5.3 Wirkungsdynamik vom Glu-Plasminogen

Nach Feststellung der thrombolytischen Wirkung vom humanen Glu-PLG wurde in der folgenden Teilstudie als Ziel gesetzt, die Wirkungsdynamik vom humanen Glu-PLG über einen 48-stündigen Zeitrahmen näher zu analysieren. Obwohl keine Blutungskomplikationen in der gesamten Studie beobachtet wurden, war es wichtig festzustellen, ob eine PLG-Therapie gut kontrollierbar und mit nur vorübergehender Wirkung wäre. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde eine humanes Glu-PLG Dosis im mittleren Bereich (0,6 mg/kg) angewendet. Dadurch ließ sich die Frage beantworten, ob zum Aufrechterhalten der Thrombolyse eine erneute PLG-Dosis im einem bestimmten Zeitrahmen verabreicht werden müsste.

Die Behandlung erfolgte innerhalb von dem in der ersten Teilstudie etablierten 4 h-Therapiefenster. Die Zeitpunkte 6 h, 12 h, 18 h, 24 h und 48 h wurden als zeitliche Endpunkte des Versuchs genommen. Die Therapiewirkung wurde mittels der gleichen Methoden wie in den vorherigen Teilstudien evaluiert.

5.3.1 Wirkungsdynamik vom Glu-Plasminogen auf die GFR

Humanes Glu-PLG (0,6 mg/kg) konnte keinen signifikanten Schutz vor GFR-Abfall nach CCE leisten. Diese Beobachtung hat sich bei allen drei ausgewählten Zeitpunkten bestätigt (**Abb. 42**). Dies hat zum Großteil die Beobachtungen von Teilstudie 2 bestätigt. Humanes Glu-PLG

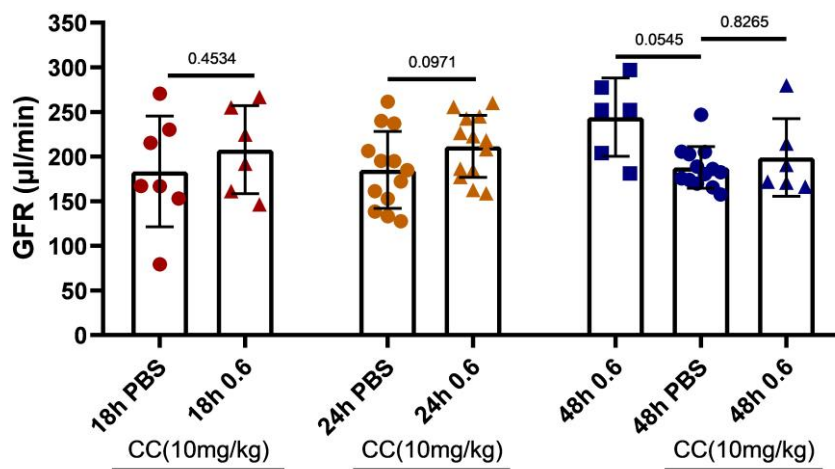


Abbildung 42: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf die GFR. Quantitative Analyse der GFR nach der Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Messungen \pm SEM dar. Eine Behandlung mit Hu Glu-PLG (0,6 mg/kg) 4 h postoperativ hat zu keiner signifikanten Besserung der Nierenfunktion nach 18 h, 24 h und 48 h im Vergleich zu nicht behandelten PBS-Kontrollgruppen geführt.

5.3.2 Zeitdynamik der Thrombolyse nach Glu-Plasminogengabe

Die Analyse der Gefäßobstruktionen ergab einen positiven Effekt in den früheren Phasen, wobei humanes Glu-PLG (0,6 mg/kg) einen transitorischen protektiven Effekt gegen Cholesterinkristallthrombosen demonstrierte (**Abb. 43, 44**).

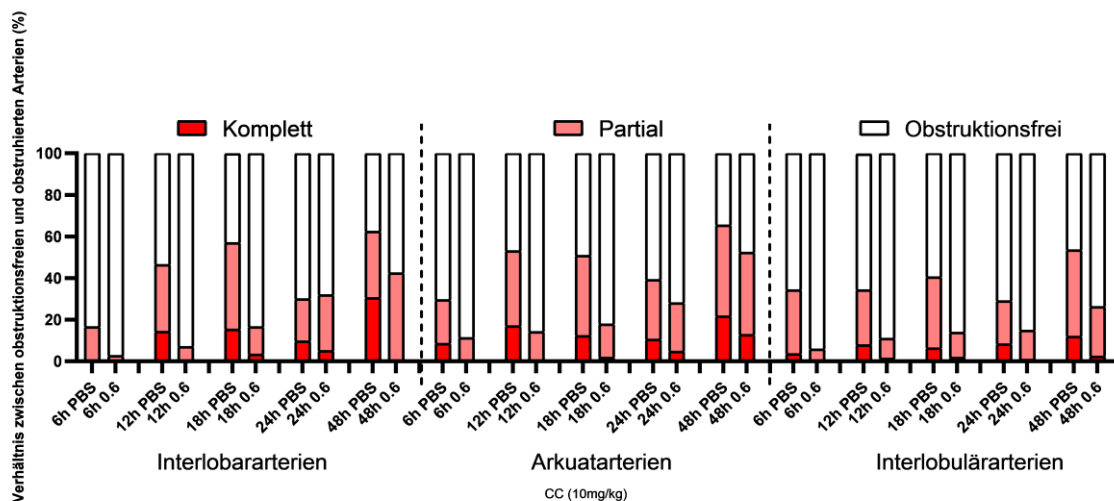


Abbildung 43: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf Gefäßobstruktionen (graphische Darstellung). Semiquantitative Bestimmung des arteriellen Obstruktionsgrads. Partielle und komplette Obstruktionen sind im Verhältnis zu den obstruktionsfreien Gefäßen dargestellt. Humanes Glu-PLG (0,6 mg/kg) konnte bei fast allen untersuchten Zeitpunkten nach CCE-Induktion die Zahl an Gefäßobstruktionen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen reduzieren. Nichtsdestotrotz nahm die Obstruktionszahl im weiteren Zeitverlauf kontinuierlich zu.

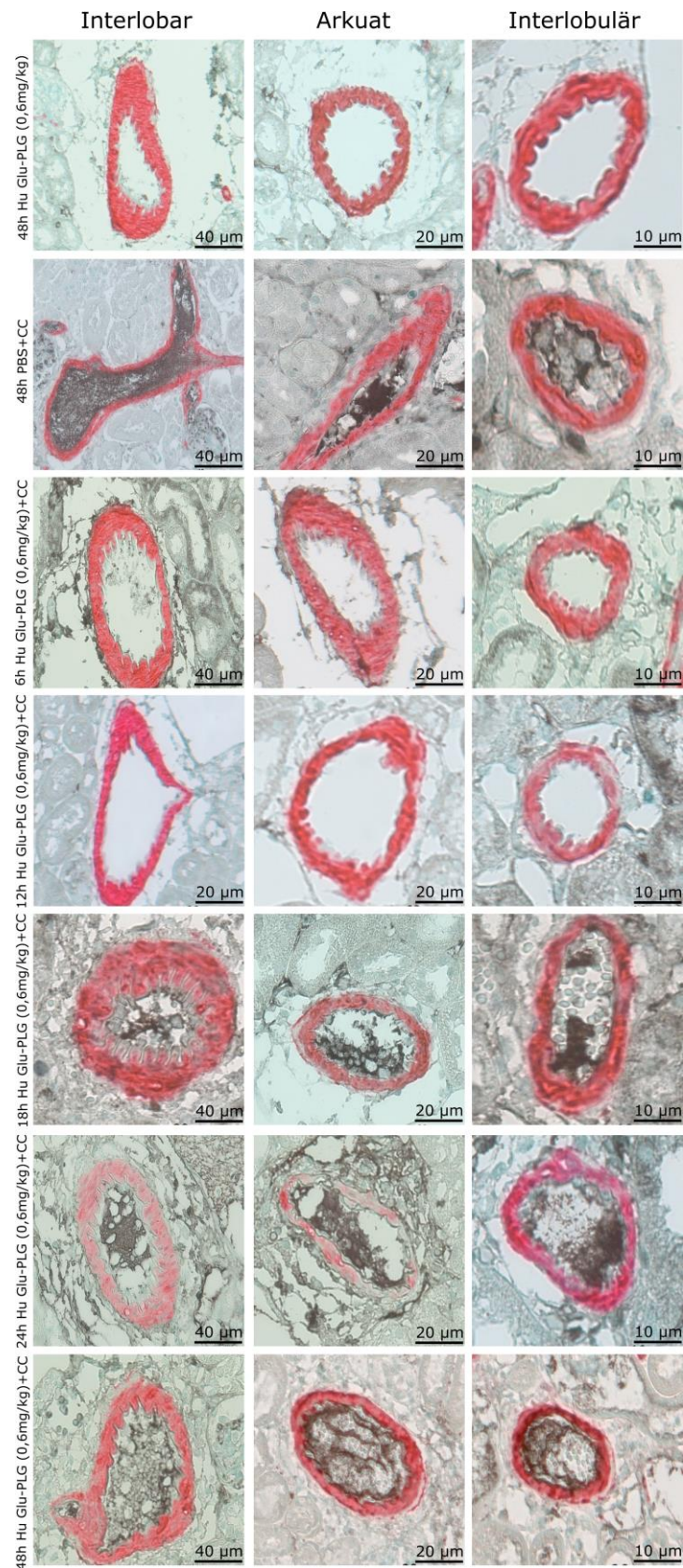


Abbildung 44: Zeitdynamik der Hu Glu-PLG-Wirkung auf Gefäßobstruktionen (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Obstruktionen in den verschiedenen Nierenarterien über einen 48 h-Zeitrahmen nach Behandlung mit Hu Glu-PLG (0,6 mg/kg).

5.3.3 Zeitdynamik der Nierenschäden nach Glu-Plasminogengabe

Die makroskopische Untersuchung der Nieren über einen 48 h-Zeitraum nach CCE-Induktion und Behandlung mit Hu Glu-PLG (0,6 mg/kg) 4 h postoperativ ergab eine Zunahme von Nierenschwellung und Diskolorationen ab dem 12 h-Zeitpunkt (**Abb. 45**). Dabei wurde kein protektiver Effekt nachgewiesen.

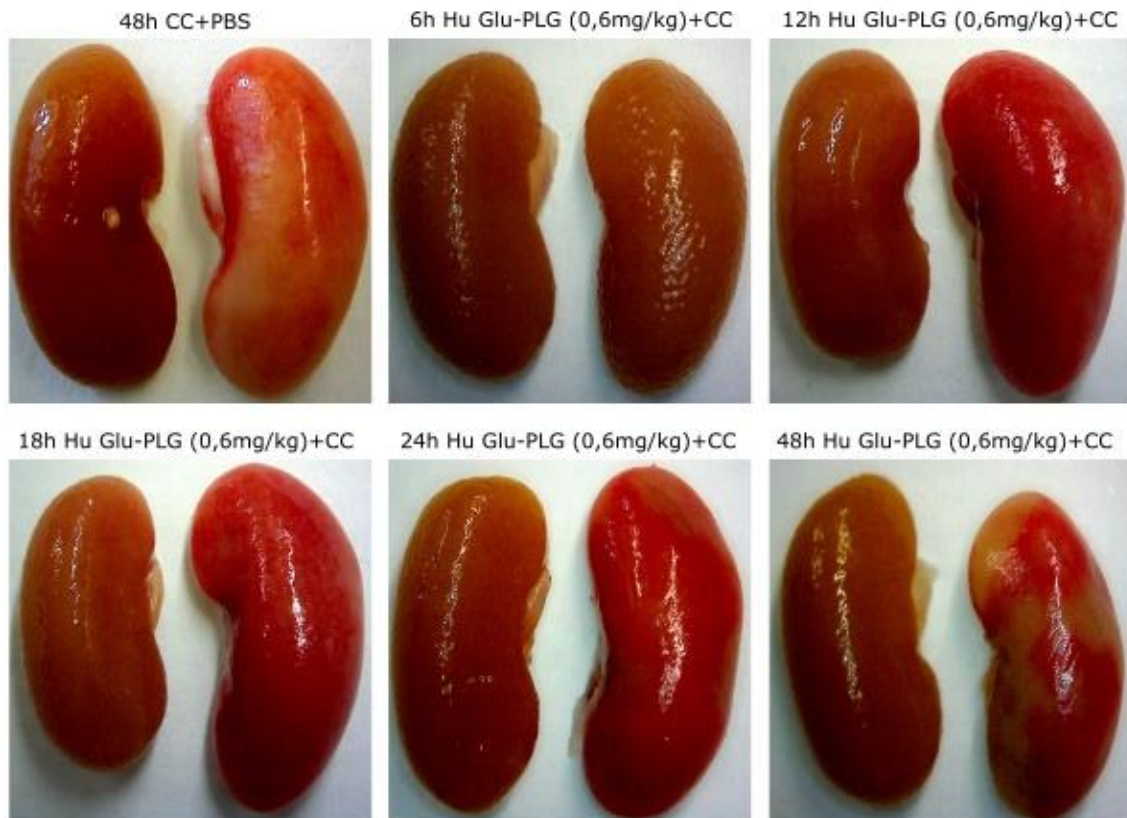


Abbildung 45: Makroskopische Nierenaufnahmen nach Hu Glu-PLG (0,6 mg/kg)-Behandlung
Auf der rechten Seite der jeweiligen Aufnahmen sind die mit CC-behandelten Nieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollnieren (linke Seite) dargestellt. Dabei ist eine progrediente Zunahme von makroskopischen Infarktzeichen ab dem 12 h-Zeitpunkt ersichtlich.

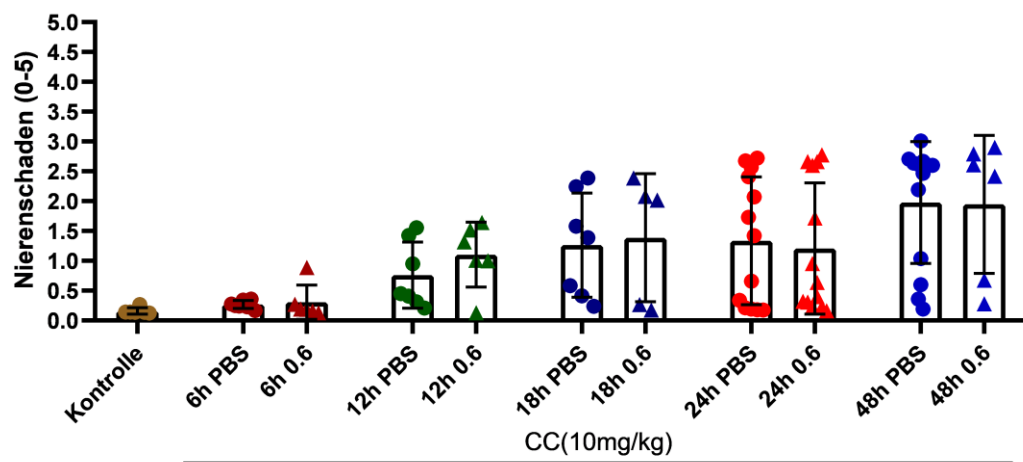


Abbildung 46: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Nierenschäden (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse der histologischen Merkmale des Nierenschadens nach CCE. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. Dargestellt sind Gruppen, die humanes Glu-Plasminogen (0,6 mg/kg) 4 h postinterventionell i.v. verabreicht bekommen haben und nicht behandelte PBS-Kontrollgruppen für die jeweiligen Zeitpunkte nach CCE.

Im Kontrast zu den Befunden bei der Bestimmung der Obstruktionszahlen ergab die mikroskopische Untersuchung mittels PAS-Reaktion keinen signifikanten protektiven Effekt vom humanen Glu-Plasminogen (0,6 mg/kg) auf CCE-bedingte ischämische Nierenschäden (**Abb. 46, 47**). Diese waren insbesondere ab 12 h nach der CC-Injektion nachweisbar. Der Zeitverlauf der ischämischen Nierenschäden war ähnlich in den behandelten und nicht behandelten Tieren. Zum 48 h – Zeitpunkt wiesen Nieren in beiden Gruppen ausgedehnte Bereiche mit Tubulusnekrosen und Parenchymödemen auf (**Abb. 47**).

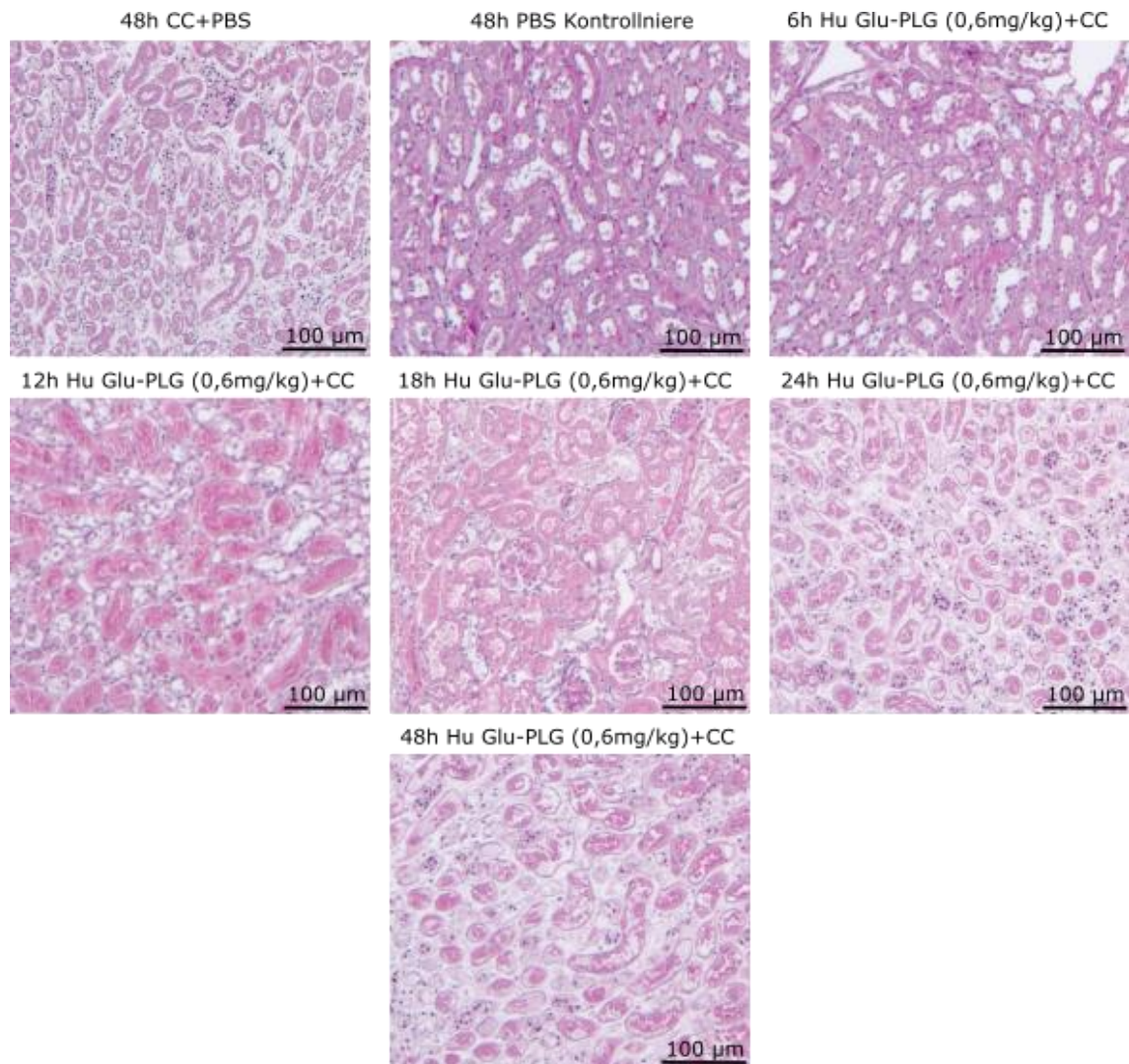


Abbildung 47: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Nierenschäden (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der Nieren für die jeweiligen Zeitpunkte nach der CC-Injektion. Es ließ sich eine progrediente Zunahme von Nierenparenchymödem und Tubulusnekrosen ab dem 12 h-Zeitpunkt nachweisen.

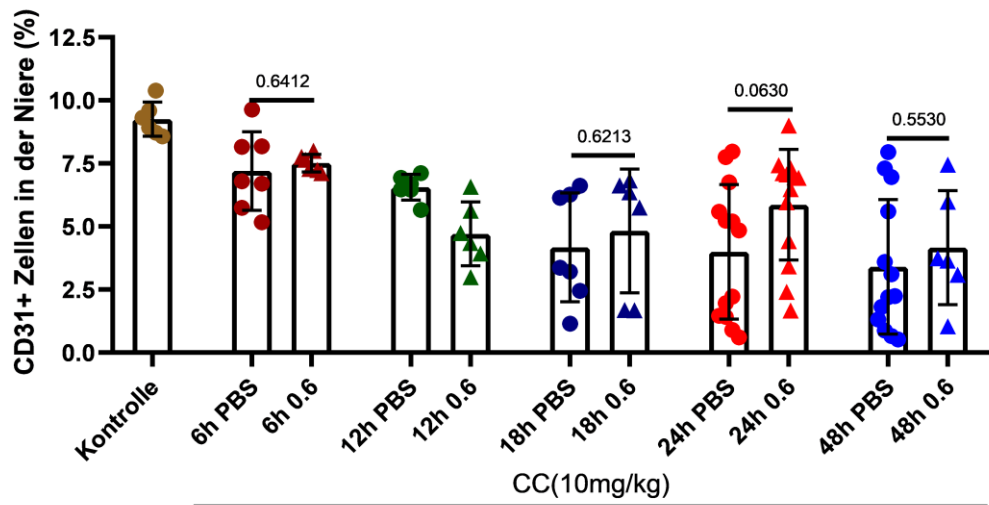


Abbildung 48: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Mikrovaskulaturschäden (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse von CD31-positiven Endothelzellen für verschiedene Zeitpunkte nach CCE-Induktion. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. Dargestellt sind Gruppen, die humanes Glu-Plasminogen (0,6 mg/kg) 4 h postinterventionell i.v. verabreicht bekommen haben und nicht behandelte PBS-Kontrollgruppen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Analyse der Endothelzellviabilität beobachtet. Die Behandlung mit humanem Glu-PLG (0,6 mg/kg) wies keinen protektiven Effekt auf die CD31-positive Mikrovaskulatur im Vergleich zu nicht behandelten PBS-Kontrollgruppen auf (**Abb. 48**). Hierbei zeigte sich zudem in beiden Gruppen einen progredienten Verlust von CD31-positiven Mikrovaskulaturzellen im 48-stündigen Verlauf nach der CC-Injektion. Zum 48 h Zeitpunkt konnte in der Mehrzahl der Nieren mikroskopische einen ausgeprägten Endothelzellverlust festgestellt werden (**Abb. 49**).

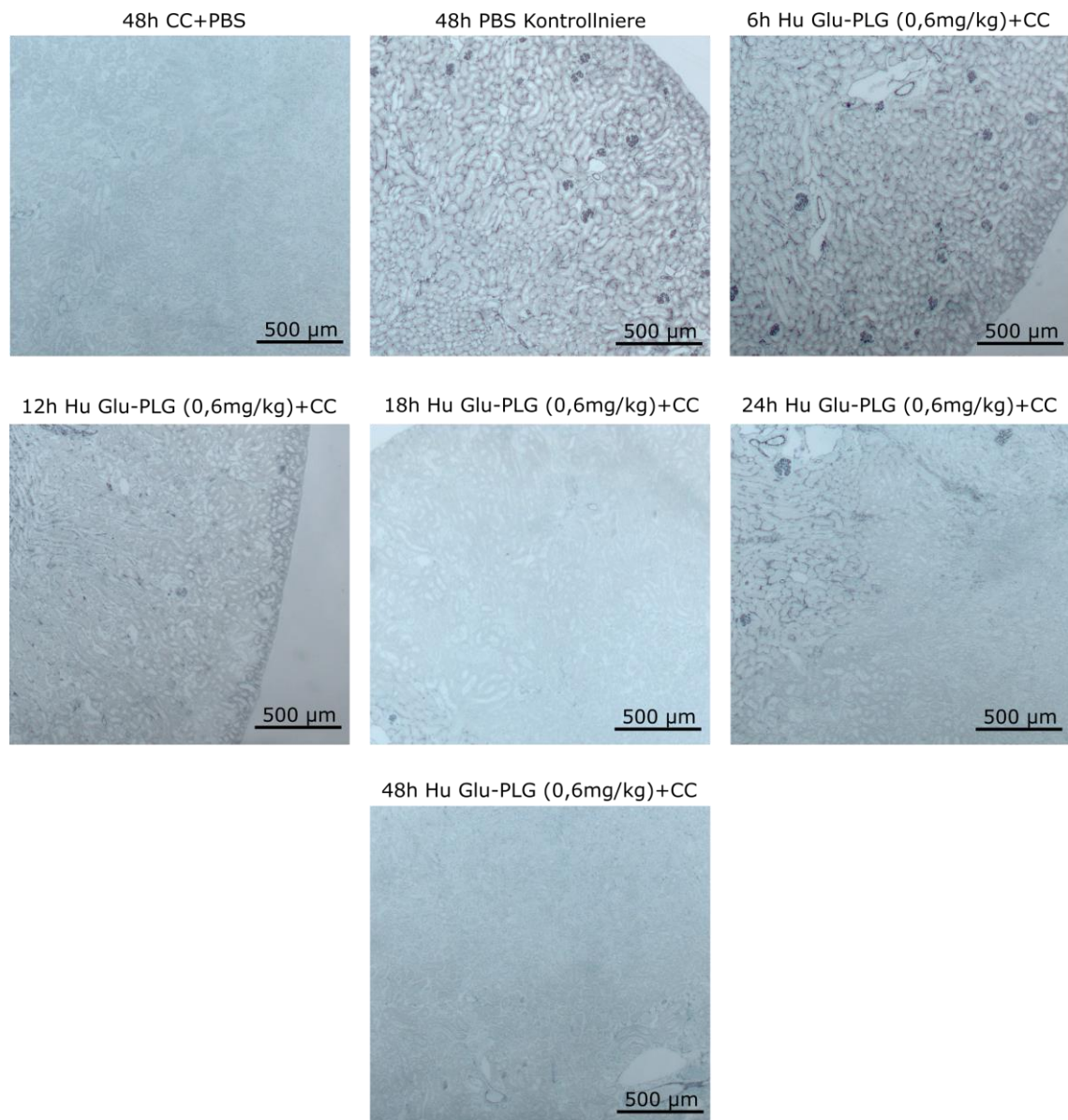


Abbildung 49: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Mikrovaskulaturschäden (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der CD31+ Zellen in den Nieren für die jeweiligen Zeitpunkte nach der CC-Injektion. Es ließ sich ein progredient zunehmender Verlust von CD31+ Endothelzellen ab dem 12 h-Zeitpunkt feststellen.

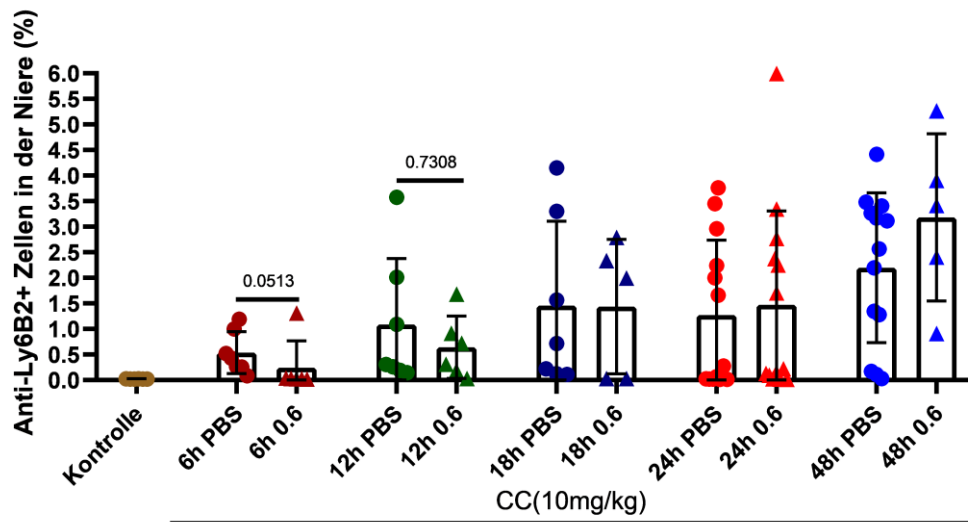


Abbildung 50: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (graphische Darstellung). Semiquantitative Analyse von Anti-Ly6B+ Zellen nach CC-Injektion und darauffolgender Behandlung mit humanem Glu-PLG (0,6 mg/kg). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar.

Humanes Glu-PLG (0,6 mg/kg) konnte ebenso keinen signifikanten Einfluss auf die infarktbedingte periläsionäre Neutrophileninfiltrationsdynamik demonstrieren im Vergleich zu nicht behandelten PBS – Kontrollgruppen (**Abb. 50**). Im Zeitverlauf nach der CC-Injektion ließ mikroskopisch sich eine progrediente Infiltration von Neutrophilen in das Nierenparenchym beobachten. Zum 48 h – Zeitpunkt waren die Infiltrate vermehrt periläsionär konzentriert, zu den früheren Zeitpunkten hingegen relativ gleichmäßig über dem Nierenparenchym verteilt (**Abb. 51**).

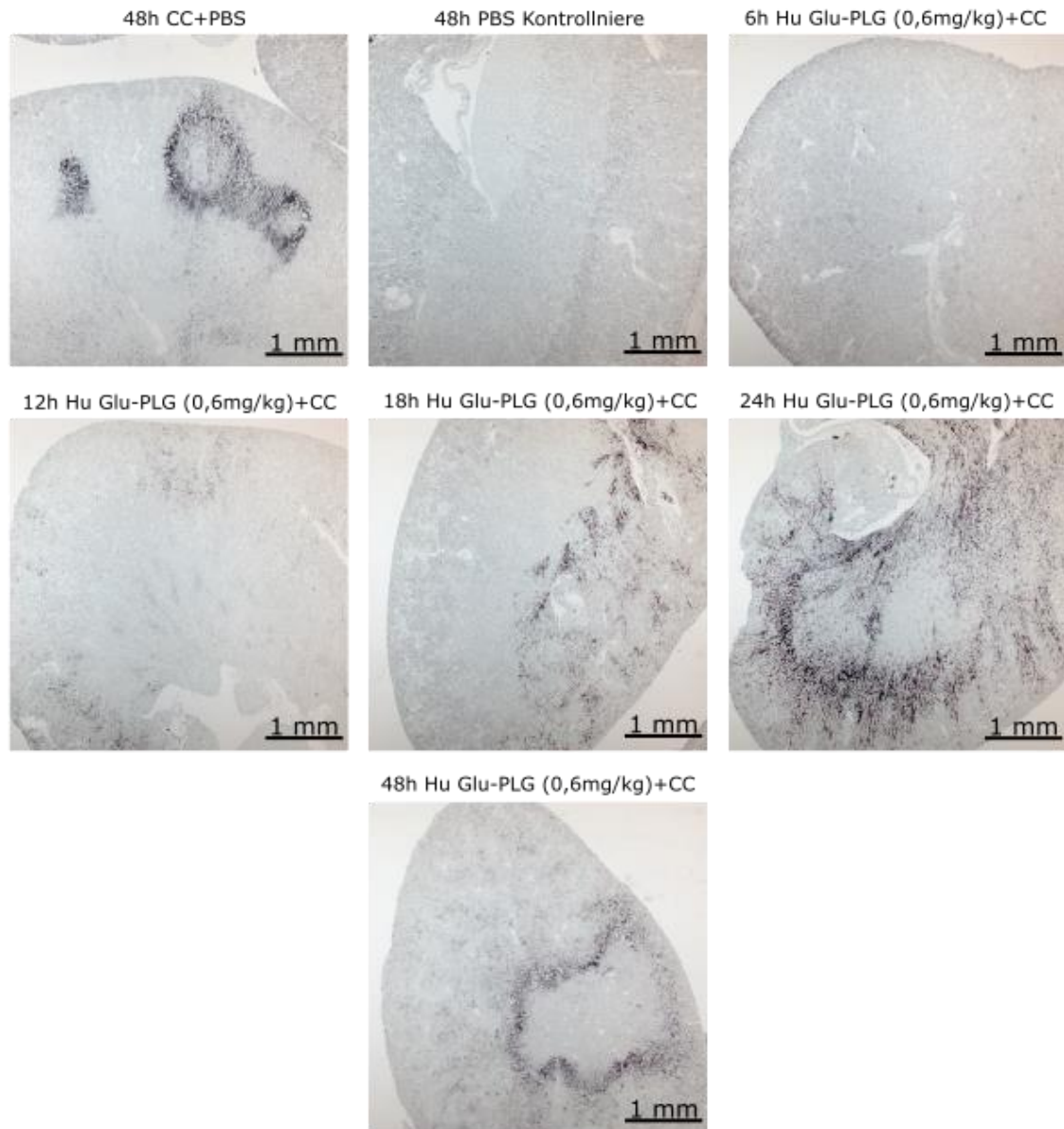


Abbildung 51: Zeitdynamik des Hu Glu-PLG-Effekts auf CCE-bedingte Neutrophileninfiltration (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung der Neutrophileninfiltrationsdynamik nach CCE-Induktion und Behandlung mit humanem Glu-PLG 4 h postoperativ. Es ließ sich eine progredient zunehmende Neutrophileninfiltration ab dem 12 h-Zeitpunkt beobachten. Die Neutrophileninfiltraten waren zu den späteren Zeitpunkten vermehrt periläsionär konzentriert.

Aufgrund der Befunde aus dieser Teilstudie lässt sich vermuten, dass humanes Glu-PLG in der 0,6 mg/kg Dosis eine lediglich transitorische Wirkung auf die Progression von Kristallthrombosen aufweist. Diese Wirkungsdauer war laut der Ergebnisse aus der Teilstudie auf 6-12 h nach der CCE-Induktion begrenzt. Ab dem 18 h-Zeitpunkt war das humane Glu-PLG nicht mehr in der Lage, Gefäßobstruktionen in den von CCE-betroffenen Nieren vorzubeugen.

5.4 Interaktion zwischen Lys- und Glu-Plasminogen

In der letzten Teilstudie wurde der Effekt von verschiedenen Glu-PLG und Lys-PLG Mischungsverhältnissen auf die Thrombolyse erläutert. Die Halbwertszeit vom Lys-PLG ist in der Regel kürzer als die vom Glu-PLG (115). Dadurch lässt sich vermuten, dass eine höhere Lys-PLG Konzentration im Plasminogenendprodukt eine negative Auswirkung auf den Thrombolyseablauf haben könnte. Um diese potenziell negative Auswirkung zu untersuchen, wurden 3 verschiedene Mischungsverhältnisse jeweils 4 h nach dem CCE-auslösenden Ereignis i.v. appliziert. Die hier verwendete PLG-Gesamtdosis entsprach der ausgewählten Konzentration aus der vorherigen Teilstudie, nämlich 0,6 mg/kg. Eine GFR-Messung nach 24 h, sowie eine immunhistochemische Analyse der Nieren, wurden auch hier durchgeführt.

5.4.1 Auswirkung auf den Nierenfunktionsverlust

In der Untersuchung der GFR 24 h nach der CC-Injektion konnte in keiner Gruppe ein Schutz vor CCE-bedingtem GFR-Abfall im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nachgewiesen werden (**Abb. 52**).

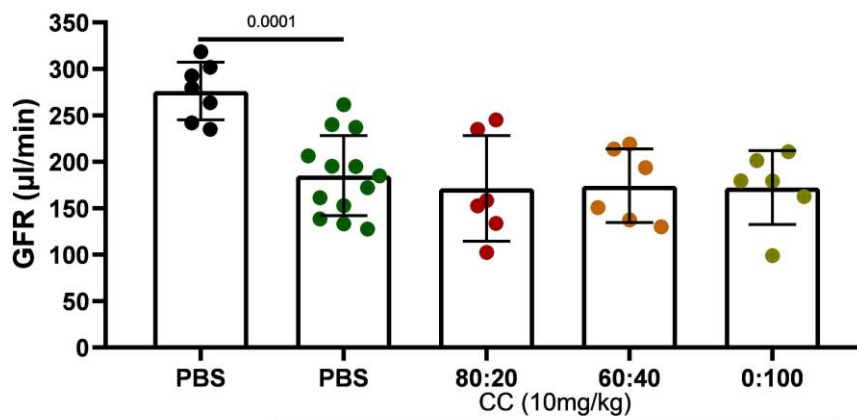


Abbildung 52: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf den CCE-bedingten GFR-Verlust. Quantitative Analyse der GFR nach der beschriebenen Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Messungen \pm SEM dar. Ein statistisch signifikanter GFR-Abfall infolge von CCE ist nach 24 h nachweisbar. Es konnte keine signifikante Verbesserung der GFR für die verschiedenen Glu-PLG/Lys-PLG Mischungsverhältnisse erreicht werden.

5.4.2 Auswirkung auf CCE-verursachte Gefäßobstruktionen

Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei der Bestimmung der Gefäßobstruktionen. Mit Erhöhung der Lys-PLG-Konzentration im Verhältnis zum Glu-PLG wurde eine progrediente Erhöhung der Gefäßobstruktionszahl beobachtet (**Abb. 53**). Jedoch konnte auch nach Behandlung mit dem Glu-PLG/Lys-PLG (80:20) Kombinationspräparat keine Reduktion von arteriellen Obstruktionen im Vergleich zur nicht behandelten PBS-Kontrollgruppe erreicht werden. Dies galt sowohl für die partiellen, als auch für die kompletten Gefäßobstruktionen (**Abb. 54**).

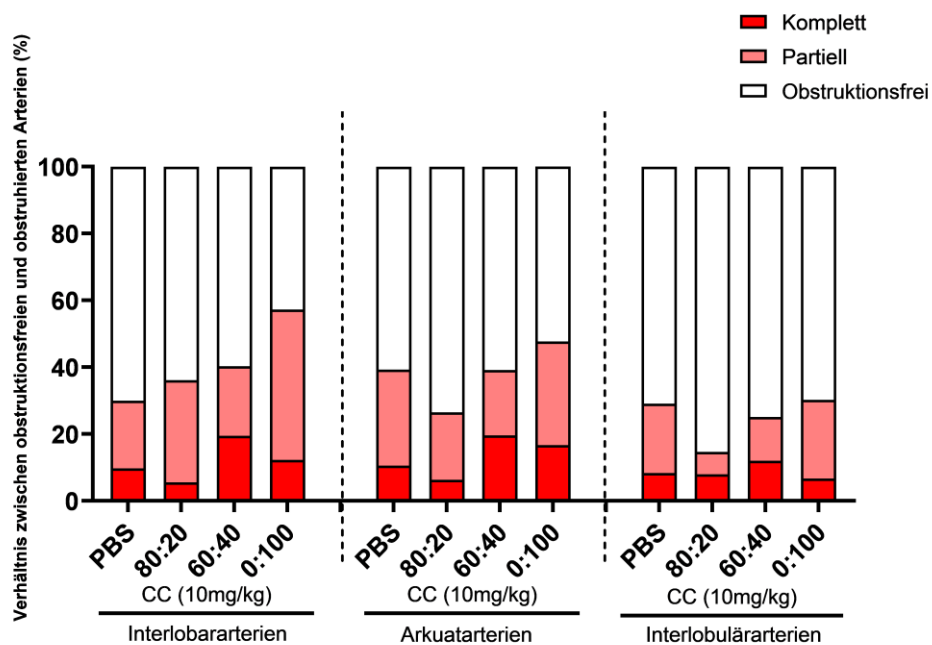


Abbildung 53: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Gefäßobstruktionen (graphische Darstellung). Semiquantitative Bestimmung des arteriellen Obstruktionsgrads. Partielle und komplette Obstruktionen sind im Verhältnis zu den obstruktionsfreien Gefäßen dargestellt. Es zeigt sich eine vermehrte Anzahl von arteriellen Obstruktionen bei höheren Lys-PLG Konzentrationen. Dargestellt sind verschiedene Mischungsverhältnisse von Glu-PLG zu Lys-PLG in einer Gesamtkonzentration von 0,6 mg/kg.

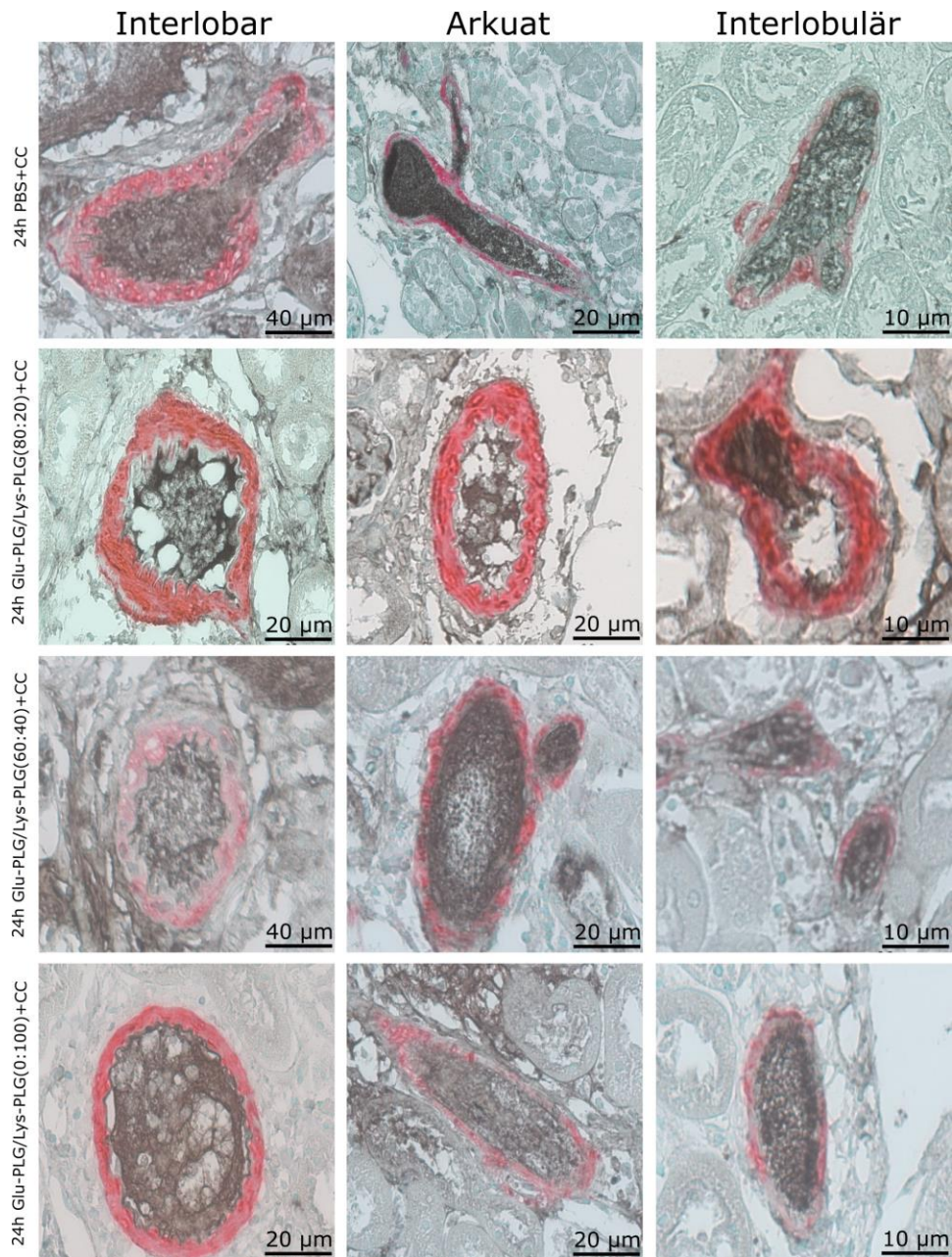


Abbildung 54: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Gefäßobstruktionen (repräsentative Bilder). Repräsentative Darstellung von Obstruktionen in den verschiedenen Nierenarterien zum 24 h-Zeitpunkt nach Behandlung mit verschiedenen Glu-PLG/Lys-PLG Mischungsverhältnissen. Für alle Gruppen wurden nach 24 h ausgedehnte Gefäßobstruktionen über die drei Arteriengrößen beobachtet.

5.4.3 Auswirkung auf ischämische Nierenschäden

Die makroskopische Untersuchung der betroffenen Nieren ergab für alle verwendete Glu-PLG/Lys-PLG Verhältnisse keine Reduktion von CCE-bedingten Nierenschwellung und äußeren Diskolorationen (**Abb. 55**).

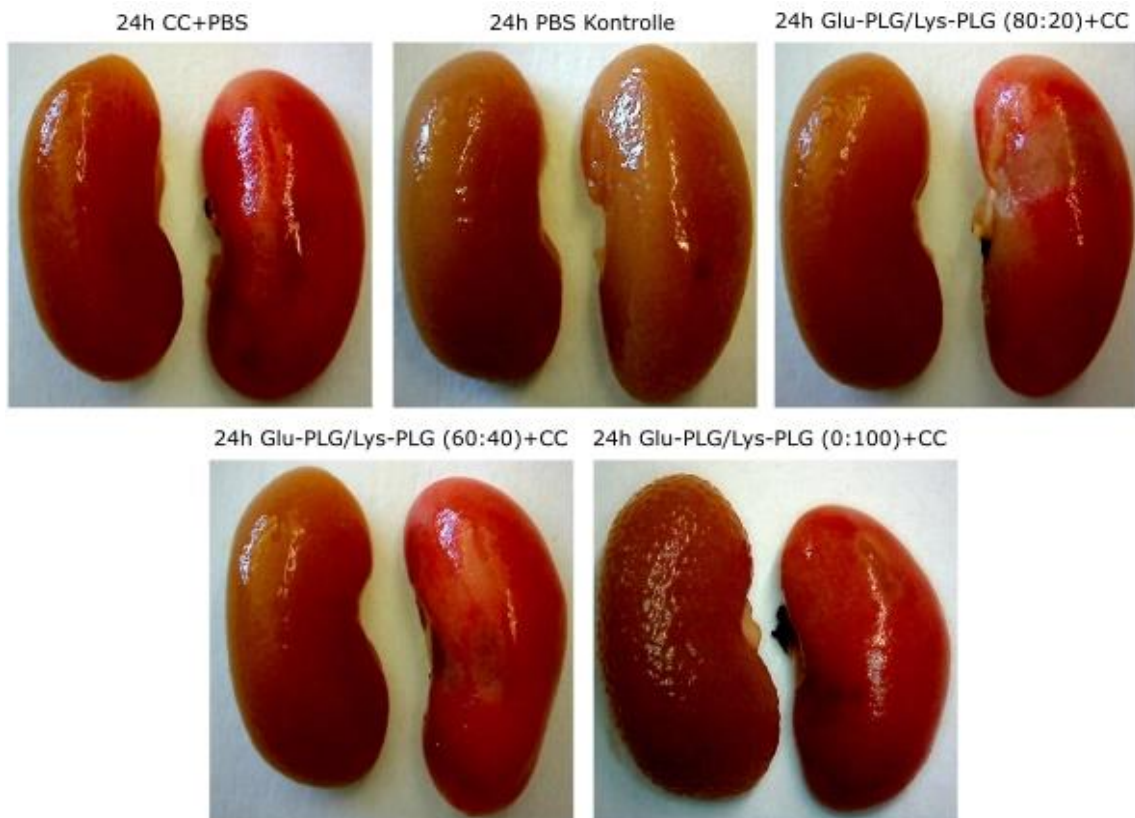


Abbildung 55: Makroskopische Nierenaufnahmen nach Behandlung mit Lys-PLG/Glu-PLG Auf der rechten Seite der jeweiligen Aufnahmen sind die mit CC-behandelten Nieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollnieren dargestellt. Dabei ist kein protektiver Effekt für die verschiedenen Lys-PLG/Glu-PLG Kombinationspräparate nachweisbar.

In der immunhistochemischen Analyse ließ sich nach der Behandlung mit verschiedenen Lys-/Glu-PLG Kombinationspräparaten ebenso kein Schutz vor ischämischen Nierenschäden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollnieren feststellen (**Abb. 56**).

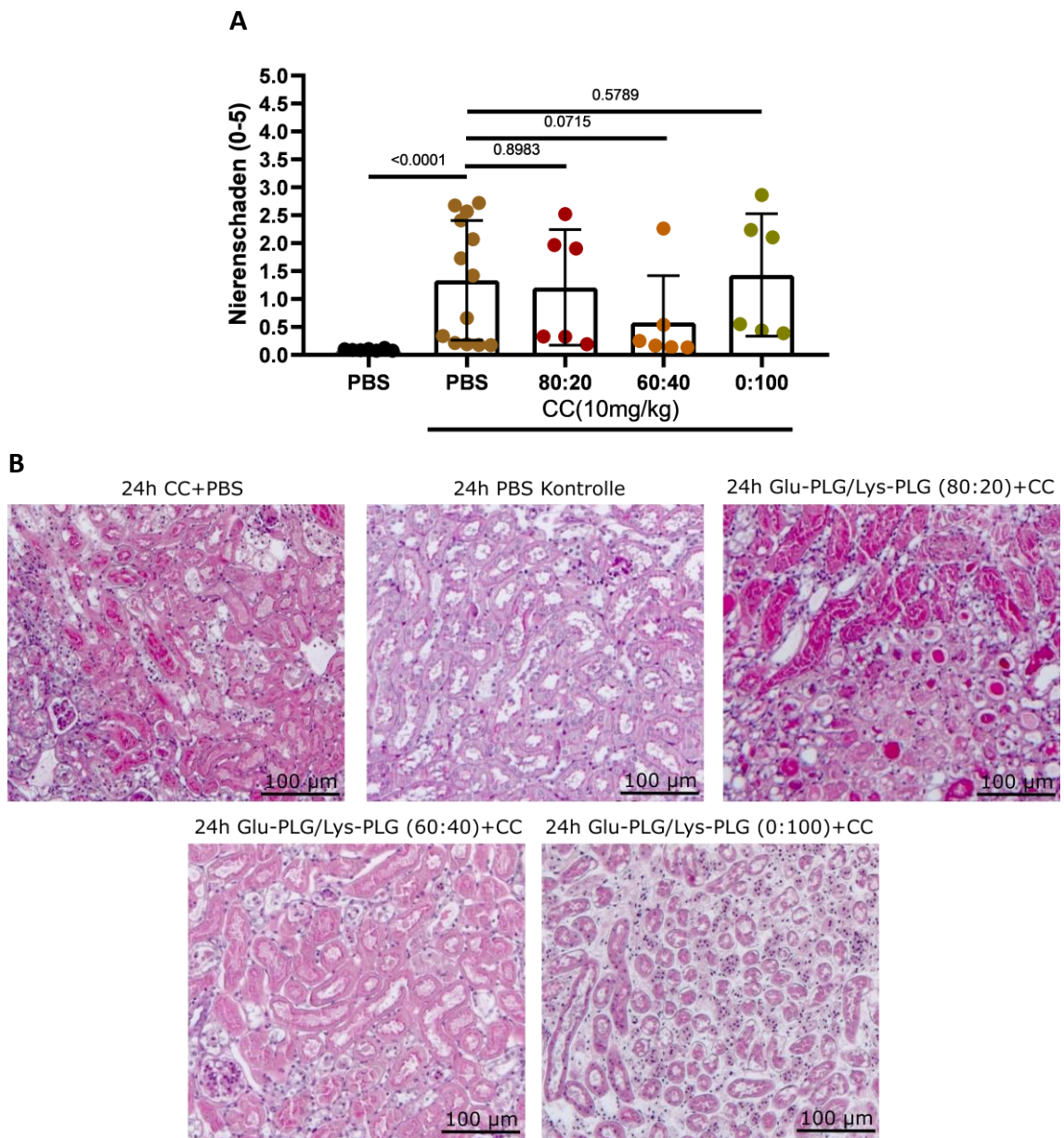


Abbildung 56: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf CCE-bedingte Nierenschäden A: Semiquantitative Analyse der histologischen Merkmale des Nierenschadens nach CCE. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Glu-PLG/Lys-PLG Mischungsverhältnisse. Hierbei konnte keine protective Wirkung durch die jeweiligen Kombinationspräparate nachgewiesen werden.

Die CD31-positiven Endothelzellen waren zum 24 h-Zeitpunkt nach CC-Injektion im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren an ihrer Zahl reduziert, wobei keine protective Wirkung auf die Mikrovaskulatur nachgewiesen wurde (**Abb. 57**).

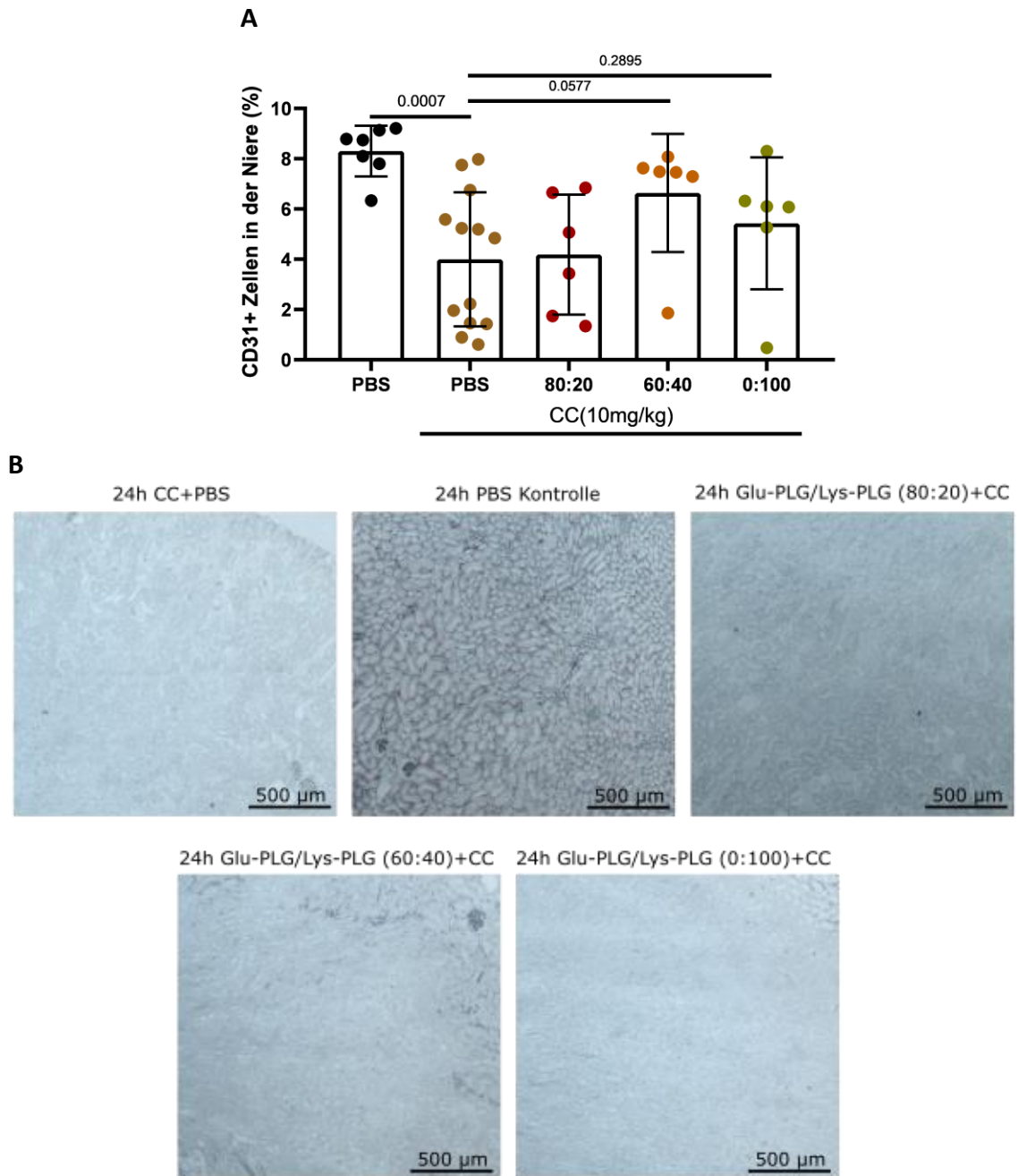


Abbildung 57: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf den CCE-bedingten Mikrovaskulaturverlust. A: Semiquantitative Analyse von CD31+ Zellen nach 24 h nach der CC-Injektion. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Glu-PLG/Lys-PLG Mischungsverhältnisse 24 h nach der CC-Injektion. Es ließ sich ein Verlust von CD31+ Zellen über alle behandelten Gruppen feststellen.

Die periläsionäre Neutrophileninfiltration konnte durch die Lys/Glu-PLG-Behandlung nicht verhindert werden (**Abb. 58A**). Anti-Ly6B+ Zellen zeigten 24 h nach der CCE-Induktion in allen 3 Gruppen eine deutliche Nierenparenchyminfiltration (**Abb. 58B**)

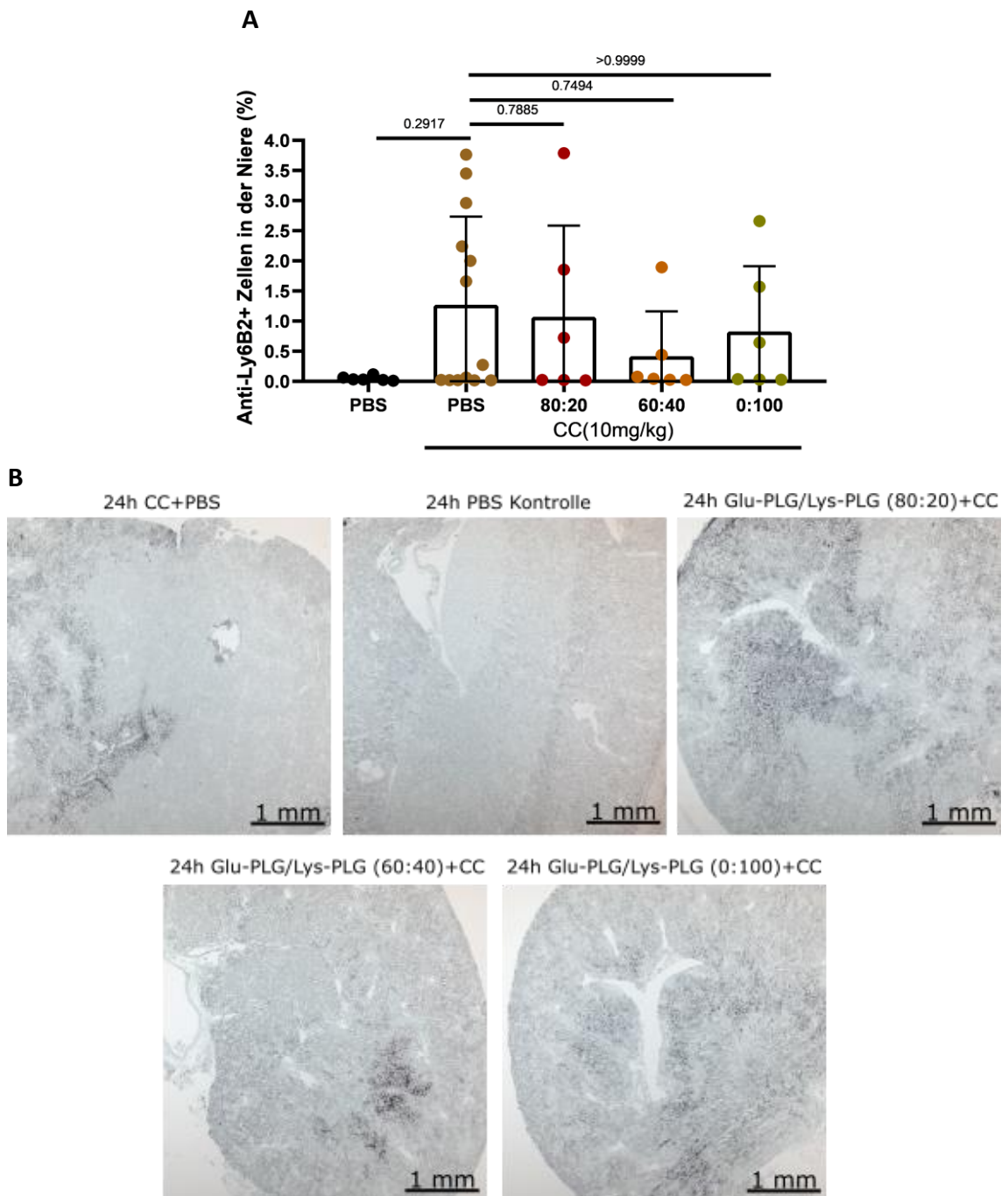


Abbildung 58: Auswirkung vom Lys-Plasminogen auf die CCE-bedingte Neutrophileninfiltration A: Semiquantitative Analyse von Anti-Ly6B⁺ Zellen nach CC-Injektion und darauffolgende Behandlung mit Glu-PLG/Lys-PLG-Kombinationspräparaten. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert von allen Scores \pm SEM dar. B: Repräsentative Bilder für die jeweiligen Gruppen. Eine Reduktion der Neutrophileninfiltration konnte in von CCE betroffenen Nieren 24 h postoperativ nicht nachgewiesen werden.

Schlussendlich zeigte diese Teilstudie, dass sogar geringe Mengen an Lys-PLG einen erheblichen Einfluss auf die thrombolytische Effektivität haben können. Wiederum hat Glu-PLG die entscheidende Rolle bei der Auflösung von durch CCE-bedingten arteriellen Thrombosen.

Zusammenfassend ließ sich anhand der vier Teilstudien demonstrieren, dass eine rechtzeitige Glu-PLG-Behandlung innerhalb vom 4 h-Zeitfenster thrombotische Angiopathien, Nierenfunktionsverlust und ischämische Schäden infolge von CCE dosisabhängig verhindern kann.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Plasminogen sich als eine potenzielle Option in der Behandlung von renaler CCE und begleitenden Komplikationen darstellt. CCE ist eine mit hoher Letalität assoziierte Erkrankung, die meist als Folge von fortgeschrittener Atherosklerose entsteht. Zurzeit besteht für CCE keine klar etablierte Therapie, was zu schlechteren Outcomes für Patienten und einer allgemeinen Belastung des Gesundheitssystems führt. Zielführend war in dieser Arbeit die Prävention einer Plasminogendepletion während CCE-bedingter erhöhter thrombolytischer Aktivität. Die Applikation vom Plasminogen hatte das Ziel, einen ausreichenden PLG-Konzentrationspiegel am Thrombolyseort aufrechtzuerhalten und dadurch einen regelrechten Ablauf der Thrombolyse zu gewährleisten. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von einem neu entwickelten Mausmodell der CCE überprüft, der eine nähere Untersuchung der Pathophysiologie von CCE erlaubt, mit Fokus auf durch CCE-verursachten arteriellen Obstruktionen, Niereninfarkten und Organversagen. Anhand der Ergebnisse von durchgeführten Experimenten ließen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- a) Die Cholesterinkristallembolie induziert eine thrombotische Angiopathie, die sich zwischen 2 h und 18 h aus den *Ae. interlobulares* in die *Ae. interlobares* und *Ae. arcuatae* ausbreitet. Dadurch kommt es zu einer zunehmenden Anzahl von arteriellen Thrombosen, einem GFR-Verlust und ischämischer renalen kortikalen Nekrose.
- b) Die intravenöse Applikation vom Glu-PLG 4 h nach CC-Injektion in die *A. renalis* bewirkt die Auflösung von Kristallthrombosen. Die Stärke dieser thrombolytischen Wirkung lässt sich dosisabhängig steuern. Dadurch lassen sich noch die Begleitkomplikationen von CCE vorbeugen. Die Abwesenheit von Blutungskomplikationen während und nach der Behandlung demonstriert ein günstiges Sicherheitsprofil.
- c) Die Wirkung vom Glu-PLG ist transitorisch, was für eine gute Steuerbarkeit vom Glu-PLG spricht.

- d) Glu-PLG weist im Vergleich zum Lys-PLG eine höhere thrombolytische Effektivität auf.

6.1 Therapiefenster in der Thromboseetherapie

Anhand der Ergebnisse aus früheren Studien wurden bereits erste Erkenntnisse über die Bildung von Kristallthrombosen als Folge von CCE gesammelt. Insbesondere in der frühen Phase kommt die Thrombusbildung vermutlich bereits durch den Stoß von Cholesterinkristallen auf die Endothelzellen zustande, was die Ausschüttung von prokoagulatorischen Faktoren von Thrombozyten und die Aktivierung des Komplementsystems bewirkt (82,155,156). Die in dieser Studie erhobenen Befunde unterstützen diese Beobachtung, indem bereits während der ersten 2h Thrombosen in den *Ae. interobulares* detektiert waren. Eine ähnliche Thrombusbildungsdynamik wurde auch in früheren Studien am selben Mausmodell beobachtet. Die erste Thrombusbildung wurde hierbei schon während der ersten 3 h in den *Ae. interlobulares* registriert, mit progredienter Ausbreitung der Thrombosen in die *Ae. arcuatae* und *Ae. interlobares* über die folgenden 6 h und 12 h Zeitpunkte (57). Insbesondere nahm die Zahl der kompletten Gefäßobstruktionen im Zeitverlauf zu (57). In einem Hasemodell der arteriellen Thrombose wurde eine Thrombusbildung innerhalb von 60 min nach Thromboseinduktion nachgewiesen (157). Eine Untersuchung der venösen Thrombusbildung in Mäusen zeigte bereits während der ersten 3 h eine Thrombozytenadhärenz an der Gefäßintima (158). Zusammenfassend kann mithilfe von diesen Befunden aus verschiedenen Tiermodellen einen 1 bis 3 – stündigen Zeitrahmen für die Thromboseformation angenommen werden. Die Mehrzahl von Mausmodellen des Myokardinfarkts und Schlaganfalls beruhen entweder auf einer Gefäßligatur- oder einer Ischämie-Reperfusionstechnik (159, 160). Obwohl dies einen umfassenden Vergleich der Thrombusbildungsdynamik zwischen Tiermodellen von diesen zwei Krankheitsbildern und dem dargestellten Mausmodell der CCE schwierig macht, können diese Tiermodelle Hinweise auf die tolerierte Ischämiezeit bis Reperfusion für die jeweiligen Organen geben.

In Reperfusion-Tiermodellen des Myokardinfarkts wird typischerweise eine Ischämiezeit von 30 bis 90 min angewendet. Hierbei zeigen Herzen in Tiermodellen mit Ischämiezeit von < 45 min minimale Änderungen in ihrer Struktur und Funktion (161, 162). Im Gegensatz sind Ischämiezeiten von über 60 – 90 min als irreversibel betrachtet, wobei Herzen, die dieser Ischämiezeit exponiert wurden, weisen im Vergleich zu nicht reperfundierten Herzen fast keine Unterschiede auf. Dies zeigte sich insbesondere bei der histologischen Untersuchung von postischämischen Schäden (163). Dies stimmt zum Großteil mit klinisch angewendeten therapeutischen Strategien überein, wobei bei MI – Patienten eine Revaskularisation mittels einer Perkutanen Koronarintervention innerhalb von 90 min und mittels medikamentöser Fibrinolyse innerhalb von 120 min angestrebt wird (164). Das optimale Zeitfenster für die medikamentöse Thrombolyse beträgt < 30 min (165, 166).

Das therapeutische Fenster beträgt bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall typischerweise 3 h, wobei eine Therapie mit rtPA (*recombinant tissue plasminogen activator*) innerhalb von 4,5 h noch erfolgen kann (167). Dies steht im Unterschied zu einem längeren therapeutischen Fenster für die Reperfusion in Tiermodellen, wo das therapeutische Fenster laut verschiedenen Tiermodellstudien bis 12 h reichen kann (159). Dieses verlängerte therapeutische Fenster beruht vermutlich auch auf die Unterschiede zwischen den untersuchten Tieren, die alle typischerweise als gesund und jung beurteilt werden, und den meistens alten und multimorbiden Patienten, die in der Regel von Schlaganfällen betroffen sind (159). Dies wäre eventuell auch bei der Übertragung von präklinischen Ergebnissen auf ein klinisches Umfeld zu beachten, weil CCE-Patienten auch typischerweise im fortgeschrittenen Alter und multimorbid sind, was einen Einfluss auf die Etablierung von einem optimalen therapeutischen Fenster haben kann.

Für Tiermodelle der Lungenembolie werden verschiedene Vorgehensweisen angewendet. Man kann eine Lungenembolie durch eine Injektion von thrombotischen oder nicht thrombotischen Partikeln, sowie anhand verschiedener chirurgischer Techniken (168). Das Zeitfenster, während dessen die Therapie erfolgen kann, ist für

Lungenembolien sowohl in Tiermodellen, als auch für Patienten weniger fest als beim Schlaganfall und Myokardinfarkt definiert (169). In einem Tiermodell der Lungenembolie zeigte sich Urokinase-Therapie während der akuten Phase (innerhalb von 30 min nach Lungenembolie-Induktion) am effektivsten, wobei in der subakuten (10 Tage postinterventionell) und chronischen (30 Tage postinterventionell) Phase die Fibrinolyse in der Regel nur durch eine höhere Konzentration von Urokinase ermöglicht wurde (170). Klinisch betrachtet wird die thrombolytische Therapie nur für bestimmte schwerwiegende Fälle von Lungenembolie vorbehalten. Obwohl ein möglichst früher Therapiebeginn in diesen Fällen angestrebt wird, können Patienten auch innerhalb des gesamten 48 h - Zeitfensters nach Symptombeginn von der thrombolytischen Therapie profitieren (171).

Für klinisch diagnostizierte Niereninfarkte hängt die Effektivität der Revaskularisation vom Obstruktionsgrad und von der Zeit bis zur Intervention ab (172). Patienten können insbesondere durch Revaskularisation profitieren bei: 1) Einer kompletten Obstruktion einer Haupt- oder Segmentarterie mit Dauer < 6 h oder einer signifikanten Nierenfunktionsminderung im Vergleich zur Baseline (typischerweise < 50 mL/min GFR) (173), 2) partieller Obstruktion einer Haupt- oder Segmentarterie mit Dauer < 24 h (174). *Blum et al.* haben über eine Wiederherstellung der Nierenfunktion berichtet, wenn die Revaskularisierung innerhalb von 90 – 120 min erfolgt, andere Studien im Gegensatz berichten über erfolgreiche Revaskularisierung sogar 96 h nach Symptombeginn (173, 175). Die kompletten Gefäßobstruktionen sind aufgrund von ihrer Bedeutung für die glomerulären Perfusion sowohl klinisch, als auch in Tiermodellstudien von erstrangiger Bedeutung. Daher werden bei kompletten Obstruktionen kürzere Ischämiezeiten toleriert. Demzufolge sollte die Applikation von Medikamenten (in diesem Fall Plasminogen) die Zeit bis zur Bildung der kompletten Obstruktionen nicht weit überschreiten, um einen Erhalt der Nierenfunktion zu gewährleisten.

Die GFR ist ausschlaggebend bei der Beurteilung der Nierenfunktion und hängt eng mit der glomerulären Perfusion zusammen. Frühere Studien am gleichen Mausmodell

zeigten eine ca. 30 bis 40-prozentige Absenkung der GFR innerhalb von 24 h nach der CC-Injektion (57), was mit der Definition der akuten Nierenschädigung übereinstimmt. Ein Mausmodell der Ischämie-Reperfusionsschadens ergab nach einer 35-minütiger Unterbrechung des renalen Blutflusses einen ähnlichen GFR-Verlust nach 24 h, was im Anschluss von einer graduellen Wiederherstellung der Nierenfunktion innerhalb von 7 Tagen gefolgt war (176). Der GFR-Abfallschweregrad bei ANS-Patienten unterscheidet sich je nach Stadium, wobei die GFR klinisch typischerweise klinisch als „eGFR“ oder „*estimated GFR*“ angegeben wird, was im Gegensatz zu der hier direkt am Tier ermittelten GFR steht. Nichtsdestotrotz zeigen Studien für ANS-Patienten einen rapiden eGFR-Abfall von 35-45% während der ersten 24h (177). Im Unterschied zu Befunden aus CCE- und IRS-Mausmodellen wird bei Patienten im Zeitverlauf eine nur geringe Verbesserung der eGFR nach der initialen Absenkung beobachtet (57, 176, 177). Obwohl in der in dieser Arbeit durchgeführten Studie einen nur begrenzten Zeitraum nach CCE miterfasst wurde, schien auch hier der tiefste Punkt der GFR zum 18 h – Zeitpunkt erreicht zu sein, mit keiner weiteren Absenkung zum 48 h – Zeitpunkt. Obwohl die GFR-Kurve sich in dem 2-wöchigen Zeitraum nach ANS bei Patienten und Mäusen unterschiedlich verhält, beobachtet man in beiden Fällen typischerweise eine rapide Senkung der GFR (oder eGFR) nach dem auslösenden Ereignis. Dies weist insbesondere bei Patienten auf die Notwendigkeit einer zügigen nierenfunktionserhaltenden Therapie hin, weil die Nieren von oft alten und multimorbiden CCE-Patienten in der Regel weniger kompensationsfähig sind.

Obwohl die GFR und die Zahl der obstruierten Arterien in dem Kontext von CCE in dieser Studie zielführend waren, wurden auch histologische Merkmale der ANS und Niereninfarkts infolge von CCE in Betracht gezogen. Hierbei zeigten sich in der Niere gewisse Ähnlichkeiten zu dem Verlauf der histologisch beobachteten nekrotischen Schäden nach Myokardinfarkt. Während der ersten 2 bis 12h nach konnten nur geringe Nekrose- und Ödemzeichen in den Nieren beobachtet werden. Erste definitive Hinweise auf Bürstensaumverlust, tubuläre Dilatation und Zylinderbildung traten hier zum 18 h-Zeitpunkt auf. Eine weitere Progression dieser Nierenschädigungszeichen, sowie vermehrt beobachtete Nekrosen und ausgeprägtes Nierenparenchymödem ließen sich

zum 48 h-Zeitpunkt beobachten. Trotz der unterschiedlichen Obstruktionsmechanik (1-Gefäß-Obstruktion versus mehrere kleine Gefäßobstruktionen bei CCE) zeigt sich in Herzen nach Myokardinfarkt ein ähnlicher pathohistologischer Verlauf. Dieser äußert sich in Nekrosen, die erst 12 h post-MI konklusiv nachweisbar sind (178). Eine weitere Ähnlichkeit zum Myokardinfarkt bestand in der Dynamik der Neutrophileninfiltration nach CCE. Diese findet in Herzen typischerweise im 18 h – 48 h Zeitfenster nach Myokardinfarkt statt (179), was ähnlich zu der hier beobachteten Zeitdynamik der Neutrophileninfiltration ist.

Obwohl sekundäre histologische Merkmale einen Hinweis auf den Niereninfarktschweregrad geben, sind Obstruktionen für die GFR und somit für den Nierenfunktionsverlust entscheidend. Frühere Studien am gleichen Mausmodell konnten demonstrieren, dass die Behebung der Obstruktionen mittels i.v. Urokinase- oder Heparin-Injektion 1 h nach CCE einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion leistet (57). Allerdings zeigten Befunde in der ersten Teilstudie der vorliegenden Arbeit, dass zum 2 h – Zeitpunkt noch keine eindeutigen Gefäßobstruktionen stattfanden. Die Applikation vom Plasminogen zum 4 h – Zeitpunkt konnte immerhin Gefäßobstruktionen und GFR-Verlust verhindern, was ein etwas breiteres therapeutisches Fenster im Vergleich zu vorherigen Studien mit Urokinase und Heparin am diesem Mausmodell anbietet. Ein breiteres Therapiefenster könnte im klinischen Umfeld einen zusätzlichen Spielraum für Diagnosestellung und Therapieeinleitung bedeuten.

6.2 Thrombolytische Therapien

Thrombolytika finden heutzutage in der Medizin eine breite klinische Anwendung. Diese Medikamente gehören zu der Gruppe von Plasminogenaktivatoren und werden grundsätzlich zum Zweck der intravaskulären Thrombolyse verwendet (180). Sie lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen: 1) Fibrinspezifische, die hauptsächlich durch Fibrin aktiviert werden, obwohl in höherem Dosisbereich eine Aktivierung auch ohne Fibrin (wie in dem Fall von Alteplase, Reteplase und Tenecteplase) erfolgen kann, 2)

Fibrinunspezifische, die kein Fibrin für ihre Aktivierung benötigen, wie z.B. Streptokinase und Urokinase (180). Außerhalb der klinischen Anwendung wurde diese Arzneimittelklasse in verschiedenen Tiermodellen von diversen Krankheitsbildern eingesetzt.

In früheren Untersuchungen am CCE-Mausmodell wurde es schon nachgewiesen, dass die Applikation von Urokinase Gefäßobstruktionen, GFR-Verlust und ischämische Nierenschäden 24 h nach CCE vorbeugen kann (57). Bei Patienten mit einem Niereninfarkt und signifikanter Obstruktion der *A. renalis* kann eine Thrombolyse mittels kathetergesteuerter Thrombolytikum-Applikation in Betracht gezogen werden. Diese Behandlung resultiert in 76% der Fälle in einer kompletten Thrombusbeseitigung (173). Partielle Obstruktionen erlauben für ein längeres Therapiefenster (174). Nichtsdestotrotz bestehen bei dieser Intervention gewisse Risiken, nämlich Blutungen, Pseudoaneurysmabildung und akute Mesenterialiembolien mit begleitender Ischämie (181). Zusätzlich bringen invasive Interventionen auch ein CCE-Risiko aufgrund von möglicher Verletzung der atheromatösen Plaques. Wenn keine katherthergesteuerte Thrombolyse verfügbar ist, kann eine Therapie mit systemischer Thrombolytikagabe eingeleitet werden (172). Bei der systemischen Therapie sind höhere Thrombolytikakonzentrationen notwendig, was potenzielle Nebenwirkungen begünstigen kann. Insbesondere das Risiko für systemische Blutungen ist bei der systemischen thrombolytischen Therapie viel höher im Vergleich zur kathetergesteuerten (174).

Bei Schlaganfallpatienten kann eine intravenöse Alteplase-Applikation innerhalb von 4,5 h nach Symptombeginn erfolgen, was während dieses Zeitfensters zu besseren klinischen Outcomes führen kann (183). Beim Verschluss von großen proximalen Hirnarterien zeigt hingegen eine mechanische Thrombektomie in vielen Patienten bessere Ergebnisse im Vergleich zur thrombolytischen Therapie (184). Auch hier bleiben Nachblutungen eine potenziell gefährliche Komplikation. Das Risiko für einen hämorrhagischen Schlaganfall wird je nach verwendetem Thrombolytikum zwischen 1 bis 7% geschätzt (185-187). Laut einer Metaanalyse von verschiedenen

Tiermodellstudien des mechanisch bedingten ischämischen Schlaganfalls kann rtPA in bestimmten Fällen auch zu Störungen der Blut-Hirn-Schranke, einer Verschlechterung von Hirnödemen, intrazerebralen Blutungen und einer erhöhten Mortalitätsrate führen (188).

Bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt bleibt die perkutane Koronarintervention (PCI) die bevorzugte Therapiemethode, wobei bei fehlender Möglichkeit für eine PCI eine fibrinolytische Therapie mittels Alteplase, Tenecteplase oder Reteplase begonnen werden kann (180). Die Erfolgsrate der Thrombolyse bei MI-Patienten bleibt bei knapp über 50%, wobei bei 35% der Patienten keine Reperfusion und bei 10% der Patienten eine nur unzureichende Reperfusion erreicht werden kann (189). Eine Reperfusionsrate von 80% konnte in einem Tiermodell des Myokardinfarkts erreicht werden (190). Jedoch besteht insbesondere bei Patienten > 75J. ein erhöhtes Blutungs- und Schlaganfallrisiko. Aus diesem Grund wird bei diesen Patienten eine Überweisung in Kliniken empfohlen, wo eine PCI durchgeführt werden kann (189).

Auch die Therapie der Lungenembolie in einem klinischen Umfeld beinhaltet in einigen Fällen die Anwendung von Thrombolytika. Vor der Therapieeinleitung erfolgt in der Regel eine Risikoeinschätzung, wobei die thrombolytische Therapie für schwerwiegende Fälle mit einer Hypotension von < 90 mmHg vorbehalten wird (191). In diesen akuten Fällen der Lungenembolie kann die allgemeine Mortalität mittels Alteplase-Behandlung gesenkt werden (192). Die Gabe von Urokinase in einem Mausmodell der Lungenembolie zeigte sowohl die Behebung von Gefäßobstruktionen, als auch die Reduktion von Inflammationsvorgängen in behandelten Tieren (193). Auch bei dieser Patientenkohorte besteht ein erhöhtes Risiko für hämorrhagische Schlaganfälle (192). Zudem wird bei einer Alteplase-Therapie eine simultane Applikation vom unfraktionierten Heparin benötigt, um erneute Thrombosebildung zu verhindern (192), was ein potenzielles Risiko für weitere Nebenwirkungen wie die Heparin-induzierte Thrombozytopenie bringt. Im Allgemein lassen sich die bei der Fibrinolytikum-Anwendung auftretenden Nebenwirkungen auf verschiedene Mechanismen zurückführen.

Fibrinolytika üben in der Regel ihre Wirkung aus, indem sie Plasminogen in Plasmin umwandeln und somit die Fibrinolyse einleiten (194). Jedoch wird dabei das lokale Gleichgewicht von fibrinolytischen Faktoren in diesem Prozess nicht berücksichtigt, was die Thrombolyse erschwert steuerbar macht. Eine übermäßig induzierte Thrombolyse kann die lokalen Speicher von fibrinolytischen Faktoren, wie z.B. Plasminogen, überfordern und somit die Effektivität der Fibrinolyse reduzieren, wenn diese lokalen Plasminogenvorräte komplett ausgeschöpft sind (196,197). Dadurch kann das Blutungsrisiko aufgrund von Gerinnungsfaktorenmangel erhöht werden. Andererseits bringt die vermehrte Bildung von Fibrindegradationsprodukten ein erhöhtes Risiko für sekundäre Thrombosen (123). Im Gegensatz zur Therapie mit den obengenannten Fibrinolytika wird während der Plasminogentherapie die Kontrolle über den fibrinolytischen Prozess den lokalen intrinsischen PLG-Aktivatoren überlassen. Das Fehlen von Blutungskomplikationen während der vorliegenden Studie kann auf einen besser steuerbaren Thrombolyseablauf und weniger assoziierten Nebenwirkungen für eine Plasminogentherapie hinweisen. Dies kann in der Behandlung von klinisch komplexen CCE-Patienten vorteilhaft sein.

6.3 Plasminogen in der Therapie von CC-Thrombosen

Die Blutgerinnsel, die sich infolge von CCE bilden, bestehen typischerweise aus Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, einem Fibrinnetzwerk, sowie aus extrazellulärer DNA, die von beschädigten Endothelzellen freigesetzt werden (197,198). Durch die Wirkung von diesen zusätzlichen prokoagulatorischen Faktoren wird die Thrombogenese weiterhin beschleunigt. Die Prävention vom intravaskulären Thrombuswachstum durch intrinsische Fibrinolyse wird in der akuten Phase von CCE aus diesem Grund erschwert. Eine Voraussetzung für einen regelrechten Fibrinolyseablauf ist die ausreichende Menge von fibrinolytischen Faktoren in unmittelbarer Nähe vom Thrombus, wie unter anderem auch das Plasminogen. Durch übermäßige Aktivierung der fibrinolytischen Kaskade, entweder intrinsisch oder extrinsisch durch Medikamente provoziert, können lokale Plasminogenspeicher häufig ausgeschöpft werden (131). Darauf folgend entsteht ein sogenannter "lytischer Zustand", der durch eine deutlich

herabgesenkte thrombolytische Aktivität am Thromboseort gekennzeichnet ist (127,128). Im lytischen Zustand wird auch die Wirkung von extern applizierten Thrombolytika, wie z.B. Alteplase oder Streptokinase, verringert, da diese Plasminogen in Plasmin umwandeln (122). Anhand der Befunde der vorliegenden Arbeit lässt sich die Bedeutung vom Plasminogen für die Fibrinolyse bestätigen. Durch die Applikation vom Glu-PLG 4 h nach dem CCE-auslösenden Ereignis ließ sich die Progression der thrombotischen Angiopathie aufhalten. Der Effekt könnte sich durch die Rebalanzierung der lokalen Fibrinolyse mittels Auffüllung der lokalen Plasminogenspeicher erklären. Im Endeffekt bewirkte dies die Auflösung des Fibrinnetzwerks und der intraluminalen Gerinnsel. Diese Befunde unterstützen grundsätzlich die Ergebnisse, die anhand von einer Plasminogengabe in Tiermodellen der ischämischen Hirnschäden und Lungenembolie erzielt wurden (129,130).

Die hemmende Wirkung vom Glu-PLG auf die Entwicklung von Cholesterinkristallthromben war in den durchgeführten Experimenten lediglich vorübergehend. Dies war insbesondere im mittleren Dosisbereich (0,6 mg/kg) der Fall. Diese Befunde können in weiteren Plasminogen-fokussierten präklinischen und klinischen Studien auf die Notwendigkeit einer Erhaltungstherapie hinweisen, um wiederkehrende Thrombusbildung zu verhindern. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Analyse von ischämischen Nekrosen, Mikrovaskulaturverlust und Neutrophileninfiltration gemacht. Die hier beschriebene transitorische Wirkung vom Glu-PLG stimmt allerdings zum großen Teil mit der Pharmakodynamik von sonstigen klinisch verwendeten Antikoagulantien und Fibrinolytika überein (194). Aus diesem Grund ist das Fehlen von Blutungskomplikationen eher nicht auf die transitorische Wirkung vom Glu-PLG, sondern auf die spezifische physiologische Rolle vom Glu-PLG als Plasminvorläufer zuzuschreiben. Die begrenzte Konzentration von Plasminogenaktivatoren im Plasma verhindert eine übermäßige Plasminogenaktivierung und somit potenzielle hämorrhagische Komplikationen.

Glu-PLG demonstrierte in den hier durchgeführten Experimenten einen positiven Effekt sowohl in der Beseitigung von Gefäßverschlüssen, als auch in der Vorbeugung vom

Mikrovaskulaturverlust, Nierenparenchymödemen, Tubulusnekrosen und glomerulären Schäden (**Abb. 59**). Eine ähnliche Beobachtung wurde bei experimentellen Modellen der rasch-progredienten Glomerulonephritis gemacht. Eine ausreichende lokale Plasminogenkonzentration schien dabei einen protektiven Effekt auf die Glomeruli während akuten inflammatorischen Prozessen zu haben (199,200). Dies könnte noch eine potenzielle Erklärung für den allgemeinen renoprotektiven Effekt vom Plasminogen in diesem Modell der CCE liefern, da sowohl Glomerulonephritiden, als auch CCE mit akuten inflammatorischen Schäden assoziiert sind.

Als Lys-Plasminogen bezeichnet man eine alternative Konfiguration vom Plasminogen, die durch proximale Lysin-Reste am N-Terminus gekennzeichnet ist (134,141). Lys-PLG besitzt im Vergleich zum Glu-PLG eine kürzere Halbwertszeit und einen weniger spezifischen Aktivationsmechanismus (115). Es ist nicht auszuschließen, dass ein plasminogenbasiertes Medikament eine gewisse Lys-PLG-Kontamination aufweisen könnte. Dies könnte zur vorzeitigen Aktivierung im Blut und einer unspezifischen Transformation vom Glu-PLG ins Lys-PLG führen. Die vorliegende Arbeit konnte insgesamt demonstrieren, dass ein hohes Lys-PLG zu Glu-PLG Verhältnis im PLG-Endprodukt einen negativen Effekt auf die thrombolytische Effektivität haben könnte. Dies könnte sich durch den spezifischen Aktivationsmechanismus vom Lys-PLG erklären lassen. Lys-PLG spielt in der Regel eine wichtige Rolle für eine kontinuierliche PLG-Aktivierung (137). Nichtsdestotrotz sollte die Plasminogenaktivierung vorzugsweise auf der Thrombus- und Endothelzelloberfläche erfolgen, wo Glu-PLG durch ein Zusammenspiel von Rezeptoren und PLG-Aktivatoren in Lys-PLG konvertiert wird, was wiederum die weitere Plasminsynthese stimuliert. Eine Injektion vom aufbereiteten Lys-PLG-Produkt könnte zu einer unspezifischen Aktivierung im Plasma führen, was in einer niedrigeren PLG-Dosis am Thromboseort resultieren könnte. Dies, zusammen mit der kürzeren Halbwertszeit vom Lys-PLG (115), könnte eine Erklärung für die in diesem Tiermodell unzureichende thrombolytische Wirkung von Präparaten mit einer hohen Lys-PLG-Konzentration liefern.

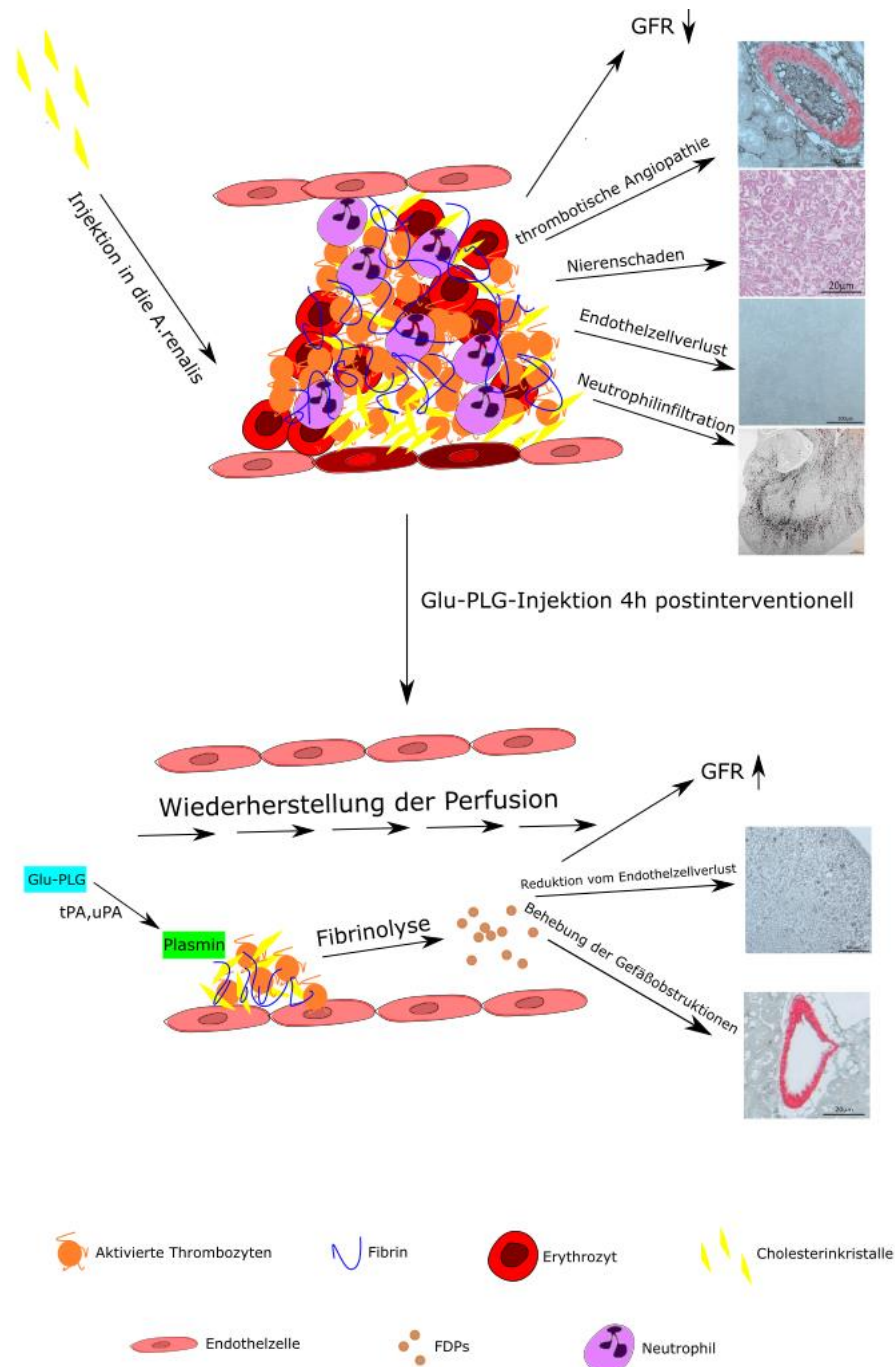


Abbildung 59: Der thrombolytische Effekt vom humanen Glu-Plasminogen. Eine Injektion von Cholesterinkristalllösung (10 mg/kg) in die *A. renalis* von 7-8 Wochen alten Mäusen ruft in der betroffenen Niere eine Cholesterinkristallembolie hervor. Die Embolisierung von Cholesterinkristallen verursacht eine thrombotische Angiopathie, was zu Gefäßobstruktionen und eingeschränkter Nierenfunktion führt. Weitere nennenswerte Komplikationen sind die Entwicklung von Tubulusnekrosen, Mikrovaskulaturverlust und eine inflammationsbedingte Neutrophileninfiltration. Durch eine intravenöse Glu-PLG Injektion 4 h nach der CC-Injektion wird der Plasma-Plasminogenspiegel supplementiert. Dies bewirkt das Aufrechterhalten des thrombolytischen Potenzials und somit die Auflösung von intraluminalen Thrombosen und die Wiederherstellung der glomerulären Perfusion, was in einer Besserung der Nierenfunktion resultiert.

Im Allgemein ließ sich mit Hilfe von diesen Experimenten die Bedeutung von einer hohen Glu-PLG-Konzentration im Verhältnis zum Lys-PLG darstellen. Das Vermeiden von einer Lys-PLG-Kontamination in einem PLG-Endprodukt ist in dem Sinne für einen optimalen Ablauf der Thrombolyse als vorteilhaft anzunehmen.

Obwohl Plasminogenaktivatoren in der Behandlung von arteriellen und venösen Thrombosen etabliert sind, bergen diese Medikamente bestimmte Nebenwirkungen und Risiken in sich, die vor einem Therapieeinsatz beachtet werden müssen. Die erhöhte Blutungsgefahr bleibt im klinischen Alltag immer noch ein erhebliches Risiko sowohl bei der Verwendung von Fibrinolytika, als auch von Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmern (198). Ein ausreichender Abstand zwischen der Dosis, die die Thrombolyse ermöglicht und der Dosis, bei der gefährliche Blutungen auftreten können, sollte in dem Sicherheitsprofil von potenziellen Medikamenten beachtet werden (198). Um den umgekehrten Effekt zu vermeiden, nämlich eine übermäßige prokoagulatorische Wirkung, sollte das Medikament auch keine Störung der intrinsischen Hämostase hervorrufen (123). Glu-PLG zeigte sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Studien als mögliches Mittel, das Fibrinbildung am Thromboseort während CCE effektiv verhindern könnte (**Abb. 59**). Dies ist in diesem Mausmodell ohne nachweisbare Störungen der primären Hämostase oder Blutungskomplikationen gelungen.

6.4 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit besteht hauptsächlich aus *in vivo* Tierexperimenten. Obwohl solche Studien für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien und Medikamenten unabdingbar geworden sind, haben sie nennenswerte Nachteile (201). Eine Übertragung der präklinischen Ergebnisse auf ein klinisches Umfeld sollte nur unter Beachtung der spezifischen Umstände und Faktoren erfolgen, die eventuell die Ergebnisse in den *in vivo* Studien beeinflusst haben könnten.

CCE in Menschen kann an verschiedenen Orten gleichzeitig vorkommen. Eine Plaqueruptur in der *Aorta abdominalis* könnte in einer CC-Freisetzung resultieren,

wodurch beide Nieren gleichzeitig betroffen sind. Das hier dargestellte Modell der CCE betrifft jedoch aus Tierschutzgründen lediglich eine Niere. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit für die Auslösung von CCE ausschließlich Cholesterinkristalle verwendet, was ein wesentlicher Unterschied zur Zusammensetzung vom atherosklerotischen Plaquekernmaterial darstellt. Dieses Kernmaterial setzt sich typischerweise nicht nur aus Cholesterin, sondern auch aus Fettzellen, Fibrin, Zellabbauprodukten und Calcium zusammen (202). Klinisch gesehen sind bei Patienten mit CCE wiederholte Infarkte durch kontinuierliche CC-Freisetzung häufig (26), wobei im hier verwendeten Mausmodell lediglich eine CC-Injektion die Niereninfarkte hervorruft. Die hier verwendeten Tiere waren alle in einem relativ jungen Alter und vor Beginn der Studie als gesund beurteilt, was im Kontrast zum typischen Alter und Erkrankungsprofil von CCE-Patienten steht (79).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit insgesamt 3 verschiedene Variationen von Plasminogen getestet wurden, konnten positive Ergebnisse nur mittels humanes Glu-PLG erzielt werden. Murines Glu-PLG konnte auch in einer relativ hohen Dosis den protektiven Effekt vom humanen Glu-PLG nicht replizieren. Dies könnte möglicherweise durch spezifische Unterschiede in der molekularen Struktur von beiden Plasminogentypen erklärt werden, die den Wirkmechanismus verändern können. Allerdings könnte die Verwendung vom humanen Glu-PLG in Mäusen eine Interspezies-Reaktivität hervorrufen.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studien ist der zeitliche Endpunkt. Die Versuche wurden auf 48 h nach der CC-Injektion limitiert, was einen nur begrenzten zeitlichen Abschnitt darstellt. Um das Gesamtbild der Effekte der Plasminogentherapie zu vervollständigen, wäre eine Verfolgung der Nierenfunktion und eine immunhistologische Evaluation der Niere über einen längeren Zeitraum empfehlenswert.

Literaturverzeichnis

1. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet*. 2019;394(10212):1949-1964. doi:10.1016/S0140-6736(19)32563-2
2. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):52. Published 2021 Jul 15. doi:10.1038/s41572-021-00284-z
3. Palevsky PM, Liu KD, Brophy PD, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Am J Kidney Dis*. 2013;61(5):649-672. doi:10.1053/j.ajkd.2013.02.349
4. Al-Jaghbeer M, Dealmeida D, Bilderback A, Ambrosino R, Kellum JA. Clinical Decision Support for In-Hospital AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):654-660. doi:10.1681/ASN.2017070765
5. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015;41(8):1411-1423. doi:10.1007/s00134-015-3934-7
6. Levey AS, James MT. Acute Kidney Injury [published correction appears in *Ann Intern Med*. 2018 Jan 2;168(1):84]. *Ann Intern Med*. 2017;167(9):ITC66-ITC80. doi:10.7326/AITC201711070
7. Abebe A, Kumela K, Belay M, Kebede B, Wobie Y. Mortality and predictors of acute kidney injury in adults: a hospital-based prospective observational study. *Sci Rep*. 2021;11(1):15672. Published 2021 Aug 2. doi:10.1038/s41598-021-94946-3
8. Silver SA, Chertow GM. The Economic Consequences of Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2017;137(4):297-301. doi:10.1159/000475607
9. Bastin AJ, Ostermann M, Slack AJ, Diller GP, Finney SJ, Evans TW. Acute kidney injury after cardiac surgery according to Risk/Injury/Failure/Loss/End-stage, Acute Kidney Injury Network, and Kidney Disease: Improving Global Outcomes classifications. *J Crit Care*. 2013;28(4):389-396. doi:10.1016/j.jcrc.2012.12.008
10. Thiele RH, Isbell JM, Rosner MH. AKI associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(3):500-514. doi:10.2215/CJN.07830814
11. Turgut F, Awad AS, Abdel-Rahman EM. Acute Kidney Injury: Medical Causes and Pathogenesis. *J Clin Med*. 2023;12(1):375. Published 2023 Jan 3. doi:10.3390/jcm12010375
12. Jefferson JA, Thurman JM, Schrier RW. Pathophysiology and Etiology of Acute Kidney Injury. In: *Elsevier eBooks*. ; 2010:797-812. doi:10.1016/b978-0-323-05876-6.00066-6
13. Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293-307. doi:10.1146/annurev-med-050214-013407
14. Libório AB, Leite TT, Neves FM, Teles F, Bezerra CT. AKI complications in critically ill patients: association with mortality rates and RRT. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):21-28. doi:10.2215/CJN.04750514
15. Romagnoli S, Clark WR, Ricci Z, Ronco C. Renal replacement therapy for AKI: When? How much? When to stop?. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017;31(3):371-385. doi:10.1016/j.bpa.2017.10.001
16. Forni LG, Chawla L, Ronco C. Precision and improving outcomes in acute kidney injury: Personalizing the approach. *J Crit Care*. 2017;37:244-245. doi:10.1016/j.jcrc.2016.08.027

17. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract.* 2012;120(4):c179-c184. doi:10.1159/000339789
18. Piéroni L, Bargnoux AS, Cristol JP, Cavalier E, Delanaye P. Did Creatinine Standardization Give Benefits to the Evaluation of Glomerular Filtration Rate?. *EJIFCC.* 2017;28(4):251-257. Published 2017 Dec 19.
19. Ronco C, Bellomo R, Kellum J. Understanding renal functional reserve. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):917-920. doi:10.1007/s00134-017-4691-6
20. Ronco C, Rizo-Topete L, Serrano-Soto M, Kashani K. Pro: Prevention of acute kidney injury: time for teamwork and new biomarkers. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(3):408-413. doi:10.1093/ndt/gfx016
21. Verma SK, Molitoris BA. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2015;35(1):96-107. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.01.010
22. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-2210. doi:10.1097/01.asn.0000079785.13922.f6
23. Han SJ, Lee HT. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury. *Kidney Res Clin Pract.* 2019;38(4):427-440. doi:10.23876/j.krcp.19.062
24. Prowle J, Bagshaw SM, Bellomo R. Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm?. *Curr Opin Crit Care.* 2012;18(6):585-592. doi:10.1097/MCC.0b013e328358d480
25. Matejovic M, Ince C, Chawla LS, et al. Renal Hemodynamics in AKI: In Search of New Treatment Targets. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):49-58. doi:10.1681/ASN.2015030234
26. Kronzon I, Saric M. Cholesterol embolization syndrome. *Circulation.* 2010;122(6):631-641. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.886465
27. Carvajal JA, Anderson WR, Weiss L, Grismer J, Berman R. Atheroembolism. An etiologic factor in renal insufficiency, gastrointestinal hemorrhages, and peripheral vascular diseases. *Arch Intern Med.* 1967;119(6):593-599. doi:10.1001/archinte.119.6.593
28. Darsee JR. Cholesterol embolism: the great masquerader. *South Med J.* 1979;72(2):174-180. doi:10.1097/00007611-197902000-00017
29. Cappiello RA, Espinoza LR, Adelman H, Aguilar J, Vasey FB, Germain BF. Cholesterol embolism: a pseudovasculitic syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 1989;18(4):240-246. doi:10.1016/0049-0172(89)90044-9
30. Vaidya PN, Finnigan NA. Atheroembolic Kidney Disease. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 22, 2023.
31. Ozkok A. Cholesterol-embolization syndrome: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag.* 2019;15:209-220. Published 2019 Jul 8. doi:10.2147/VHRM.S175150
32. Modi KS, Rao VK. Atheroembolic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(8):1781-1787. doi:10.1681/ASN.V1281781
33. Scolari F, Bracchi M, Valzorio B, et al. Cholesterol atheromatous embolism: an increasingly recognized cause of acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(8):1607-1612.
34. Tunick PA, Nayar AC, Goodkin GM, et al. Effect of treatment on the incidence of stroke and other emboli in 519 patients with severe thoracic aortic plaque. *Am J Cardiol.* 2002;90(12):1320-1325. doi:10.1016/s0002-9149(02)02870-9

35. Carroccio A, Olin JW, Ellozy SH, et al. The role of aortic stent grafting in the treatment of atheromatous embolization syndrome: results after a mean of 15 months follow-up. *J Vasc Surg.* 2004;40(3):424-429. doi:10.1016/j.jvs.2004.06.036
36. Cross SS. How common is cholesterol embolism?. *J Clin Pathol.* 1991;44(10):859-861. doi:10.1136/jcp.44.10.859
37. Drost H, Buis B, Haan D, Hillers JA. Cholesterol embolism as a complication of left heart catheterisation. Report of seven cases. *Br Heart J.* 1984;52(3):339-342. doi:10.1136/hrt.52.3.339
38. Moolenaar W, Lamers CB. Cholesterol crystal embolization in the Netherlands. *Arch Intern Med.* 1996;156(6):653-657.
39. Ramirez G, O'Neill WM Jr, Lambert R, Bloomer HA. Cholesterol embolization: a complication of angiography. *Arch Intern Med.* 1978;138(9):1430-1432.
40. Quinones A, Saric M. The cholesterol emboli syndrome in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(4):315. doi:10.1007/s11883-013-0315-y
41. Flory CM. Arterial Occlusions Produced by Emboli from Eroded Aortic Atheromatous Plaques. *Am J Pathol.* 1945;21(3):549-565.
42. THURLBECK WM, CASTLEMAN B. Atheromatous emboli to the kidneys after aortic surgery. *N Engl J Med.* 1957;257(10):442-447. doi:10.1056/NEJM195709052571002
43. Kassirer JP. Atheroembolic renal disease. *N Engl J Med.* 1969;280(15):812-818. doi:10.1056/NEJM196904102801506
44. Fine MJ, Kapoor W, Falanga V. Cholesterol crystal embolization: a review of 221 cases in the English literature. *Angiology.* 1987;38(10):769-784. doi:10.1177/000331978703801007
45. Beal MF, Williams RS, Richardson EP Jr, Fisher CM. Cholesterol embolism as a cause of transient ischemic attacks and cerebral infarction. *Neurology.* 1981;31(7):860-865. doi:10.1212/wnl.31.7.860
46. Price DL, Harris J. Cholesterol emboli in cerebral arteries as a complication of retrograde aortic perfusion during cardiac surgery. *Neurology.* 1970;20(12):1209-1214. doi:10.1212/wnl.20.12.1209
47. Masuda J, Yutani C, Ogata J, Kuriyama Y, Yamaguchi T. Atheromatous embolism in the brain: a clinicopathologic analysis of 15 autopsy cases. *Neurology.* 1994;44(7):1231-1237. doi:10.1212/wnl.44.7.1231
48. HOLLENHORST RW. Significance of bright plaques in the retinal arterioles. *JAMA.* 1961;178:23-29. doi:10.1001/jama.1961.03040400025005
49. Robinson RJ, Pemberton M, Goddard MJ. Myositis due to cholesterol emboli. *Postgrad Med J.* 1993;69(818):947-949. doi:10.1136/pgmj.69.818.947
50. Teja K, Crampton RS. Intramural coronary arteritis from cholesterol emboli: a rare cause of unstable angina preceding sudden death. *Am Heart J.* 1985;110(1 Pt 1):168-170. doi:10.1016/0002-8703(85)90533-2
51. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly Clinicopathological Exercises. Case 11-1996. A 69-year-old man with progressive renal failure and the abrupt onset of dyspnea. *N Engl J Med.* 1996;334(15):973-979. doi:10.1056/NEJM199604113341508
52. Sabatine MS, Oelberg DA, Mark EJ, Kanarek D. Pulmonary cholesterol crystal embolization. *Chest.* 1997;112(6):1687-1692. doi:10.1378/chest.112.6.1687

53. Scolari F, Ravani P. Atheroembolic renal disease. *Lancet*. 2010;375(9726):1650-1660. doi:10.1016/S0140-6736(09)62073-0
54. Thadhani RI, Camargo CA Jr, Xavier RJ, Fang LS, Bazari H. Atheroembolic renal failure after invasive procedures. Natural history based on 52 histologically proven cases. *Medicine (Baltimore)*. 1995;74(6):350-358. doi:10.1097/00005792-199511000-00005
55. Mayo RR, Swartz RD. Redefining the incidence of clinically detectable atheroembolism. *Am J Med*. 1996;100(5):524-529. doi:10.1016/s0002-9343(95)00059-3
56. Belenfant X, Meyrier A, Jacquot C. Supportive treatment improves survival in multivisceral cholesterol crystal embolism. *Am J Kidney Dis*. 1999;33(5):840-850. doi:10.1016/s0272-6386(99)70415-4
57. Shi C, Extracellular DNA contributes to cholesterol crystal embolism-induced clot formation, acute kidney injury, and tissue infarction. 2020. doi: 10.5282/edoc.27871
58. Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(12):727-744. doi:10.1038/s41569-019-0227-9
59. Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):131. Published 2022 Apr 22. doi:10.1038/s41392-022-00955-7
60. Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc Res*. 1999;41(2):369-375. doi:10.1016/s0008-6363(98)00308-3
61. Applebaum RM, Kronzon I. Evaluation and management of cholesterol embolization and the blue toe syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 1996;11(5):533-542. doi:10.1097/00001573-199609000-00013
62. Fukumoto Y, Tsutsui H, Tsuchihashi M, Masumoto A, Takeshita A; Cholesterol Embolism Study(CHEST) Investigators. The incidence and risk factors of cholesterol embolization syndrome, a complication of cardiac catheterization: a prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(2):211-216. doi:10.1016/s0735-1097(03)00579-5
63. Saklayen MG, Gupta S, Suryaprasad A, Azmeh W. Incidence of atheroembolic renal failure after coronary angiography. A prospective study. *Angiology*. 1997;48(7):609-613. doi:10.1177/000331979704800707
64. Keeley EC, Grines CL. Scraping of aortic debris by coronary guiding catheters: a prospective evaluation of 1,000 cases. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(7):1861-1865. doi:10.1016/s0735-1097(98)00497-5
65. SCHORNAGEL HE. Embolie van cholesterolkristallen bij atherosclerose [Embolism due to cholesterol crystals in atherosclerosis]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1958;102(36):1741-1743.
66. Zahn R, Mark B, Niedermaier N, et al. Embolic protection devices for carotid artery stenting: better results than stenting without protection?. *Eur Heart J*. 2004;25(17):1550-1558. doi:10.1016/j.ehj.2004.06.018
67. Roubin GS, Iyer S, Halkin A, Vitek J, Brennan C. Realizing the potential of carotid artery stenting: proposed paradigms for patient selection and procedural technique. *Circulation*. 2006;113(16):2021-2030. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595512

68. Kastrup A, Gröschel K, Krapf H, Brehm BR, Dichgans J, Schulz JB. Early outcome of carotid angioplasty and stenting with and without cerebral protection devices: a systematic review of the literature. *Stroke*. 2003;34(3):813-819. doi:10.1161/01.STR.0000058160.53040.5F
69. Agrawal A, Ziccardi MR, Witzke C, Palacios I, Rangaswami J. Cholesterol embolization syndrome: An under-recognized entity in cardiovascular interventions. *J Interv Cardiol*. 2018;31(3):407-415. doi:10.1111/joic.12483
70. Nevelsteen A, Kutten M, Lacroix H, Suy R. Oral anticoagulant therapy: a precipitating factor in the pathogenesis of cholesterol embolization?. *Acta Chir Belg*. 1992;92(1):33-36.
71. Tagaram, S; Madireddy, S; Simh, D. "CHOLESTEROL CRYSTAL SHOWER" – A RARE CASE OF ATHEROEMBOLIC RENAL DISEASE. *Journal of Hospital Medicine*. 2021.
72. Dizman N, Aydın Bahat K, Özkanlı Ş, Özkök A. Cholesterol embolization syndrome: A report of two cases. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2016;44(3):251-255. doi:10.5543/tkda.2015.94587
73. Saric M, Kronzon I. Cholesterol embolization syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2011;26(6):472-479. doi:10.1097/HCO.0b013e32834b7fdd
74. Li X, Bayliss G, Zhuang S. Cholesterol Crystal Embolism and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1120. Published 2017 May 24. doi:10.3390/ijms18061120
75. Mayo RR, Swartz RD. Redefining the incidence of clinically detectable atheroembolism. *Am J Med*. 1996;100(5):524-529. doi:10.1016/s0002-9343(95)00059-3
76. Meyrier A. Cholesterol crystal embolism: diagnosis and treatment. *Kidney Int*. 2006;69(8):1308-1312. doi:10.1038/sj.ki.5000263
77. Scolari F, Ravani P, Gaggi R, et al. The challenge of diagnosing atheroembolic renal disease: clinical features and prognostic factors. *Circulation*. 2007;116(3):298-304. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.680991
78. Lie JT. Cholesterol atheromatous embolism. The great masquerader revisited. *Pathol Annu*. 1992;27 Pt 2:17-50.
79. Scolari F, Tardanico R, Zani R, et al. Cholesterol crystal embolism: A recognizable cause of renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(6):1089-1109. doi:10.1053/ajkd.2000.19809
80. Scolari F, Ravani P, Pola A, et al. Predictors of renal and patient outcomes in atheroembolic renal disease: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1584-1590. doi:10.1097/01.asn.0000069220.60954.f1
81. Warren BA, Vales O. The ultrastructure of the stages of atheroembolic occlusion of renal arteries. *Br J Exp Pathol*. 1973;54(5):469-478.
82. Shi C, Kim T, Steiger S, et al. Crystal Clots as Therapeutic Target in Cholesterol Crystal Embolism. *Circ Res*. 2020;126(8):e37-e52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315625
83. Mulay SR, Anders HJ. Crystallopathies. *N Engl J Med*. 2016;374(25):2465-2476. doi:10.1056/NEJMra1601611
84. GORE I, MCCOMBS HL, LINDQUIST RL. OBSERVATIONS ON THE FATE OF CHOLESTEROL EMBOLI. *J Atheroscler Res*. 1964;4:527-535. doi:10.1016/s0368-1319(64)80055-7
85. Frock J, Bierman M, Hammeke M, Reyes A. Atheroembolic renal disease: experience with 22 patients. *Nebr Med J*. 1994;79(9):317-321.

-
86. Pilely K, Rosbjerg A, Genster N, et al. Cholesterol Crystals Activate the Lectin Complement Pathway via Ficolin-2 and Mannose-Binding Lectin: Implications for the Progression of Atherosclerosis. *J Immunol*. 2016;196(12):5064-5074. doi:10.4049/jimmunol.1502595
87. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237-241. doi:10.1038/nature04516
88. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [published correction appears in *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):652]. *Nature*. 2010;464(7293):1357-1361. doi:10.1038/nature08938
89. Corr EM, Cunningham CC, Dunne A. Cholesterol crystals activate Syk and PI3 kinase in human macrophages and dendritic cells. *Atherosclerosis*. 2016;251:197-205. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.035
90. Kiyotake R, Oh-Hora M, Ishikawa E, Miyamoto T, Ishibashi T, Yamasaki S. Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses. *J Biol Chem*. 2015;290(42):25322-25332. doi:10.1074/jbc.M115.645234
91. Samstad EO, Niyonzima N, Nymo S, et al. Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release. *J Immunol*. 2014;192(6):2837-2845. doi:10.4049/jimmunol.1302484
92. Niyonzima N, Samstad EO, Aune MH, et al. Reconstituted High-Density Lipoprotein Attenuates Cholesterol Crystal-Induced Inflammatory Responses by Reducing Complement Activation. *J Immunol*. 2015;195(1):257-264. doi:10.4049/jimmunol.1403044
93. Hammerschmidt DE, Greenberg CS, Yamada O, Craddock PR, Jacob HS. Cholesterol and atheroma lipids activate complement and stimulate granulocytes. A possible mechanism for amplification of ischemic injury in atherosclerotic states. *J Lab Clin Med*. 1981;98(1):68-77.
94. Tanaka M, Matsuo K, Shoda H, Takami S, Naruse M, Matsuyama K. Severe hyperreninemic hypertension associated with spontaneous renal cholesterol crystal embolization. *Clin Exp Nephrol*. 2004;8(2):150-154. doi:10.1007/s10157-003-0269-4
95. Calò LA, Schiavo S, Davis PA, et al. Angiotensin II signaling via type 2 receptors in a human model of vascular hyporeactivity: implications for hypertension. *J Hypertens*. 2010;28(1):111-118. doi:10.1097/HJH.0b013e328332b738
96. Anders HJ. Necroptosis in Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2018;139(4):342-348. doi:10.1159/000489940
97. Liu W, Chen B, Wang Y, et al. RGMb protects against acute kidney injury by inhibiting tubular cell necroptosis via an MLKL-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(7):E1475-E1484. doi:10.1073/pnas.1716959115
98. Martin-Sanchez D, Fontecha-Barriuso M, Carrasco S, et al. TWEAK and RIPK1 mediate a second wave of cell death during AKI [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 7;:]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(16):4182-4187. doi:10.1073/pnas.1716578115
99. von Mässenhausen A, Tonnus W, Himmerkus N, et al. Phenytoin inhibits necroptosis [published correction appears in *Cell Death Dis*. 2018 May 24;9(6):622]. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):359. Published 2018 Mar 2. doi:10.1038/s41419-018-0394-3
100. Kim HJ, Lee DW, Ravichandran K, et al. NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;346(3):465-472. doi:10.1124/jpet.113.205732

-
101. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45(1):86-93. doi:10.1055/s-0038-1677040
102. Nakazawa D, Desai J, Steiger S, et al. Activated platelets induce MLKL-driven neutrophil necroptosis and release of neutrophil extracellular traps in venous thrombosis [published correction appears in *Cell Death Discov*. 2019 Jul 10;5:116]. *Cell Death Discov*. 2018;4:6. Published 2018 Jun 28. doi:10.1038/s41420-018-0073-2
103. Chan NC, Weitz JI. Antithrombotic Agents. *Circ Res*. 2019;124(3):426-436. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313155
104. Blombäck M, He S, Bark N, Wallen HN, Elg M. Effects on fibrin network porosity of anticoagulants with different modes of action and reversal by activated coagulation factor concentrate. *Br J Haematol*. 2011;152(6):758-765. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08546.x
105. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358(6367):1202-1206. doi:10.1126/science.aam8897
106. Smith SC Jr, Allen J, Blair SN, et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute [published correction appears in *Circulation*. 2006 Jun 6;113(22):e847]. *Circulation*. 2006;113(19):2363-2372. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174516
107. Abela GS, Vedre A, Janoudi A, Huang R, Durga S, Tamhane U. Effect of statins on cholesterol crystallization and atherosclerotic plaque stabilization. *Am J Cardiol*. 2011;107(12):1710-1717. doi:10.1016/j.amjcard.2011.02.336
108. Yonemura K, Ikegaya N, Fujigaki Y, Suzuki H, Togawa A, Hishida A. Potential therapeutic effect of simvastatin on progressive renal failure and nephrotic-range proteinuria caused by renal cholesterol embolism. *Am J Med Sci*. 2001;322(1):50-52. doi:10.1097/00000441-200107000-00010
109. Woolfson RG, Lachmann H. Improvement in renal cholesterol emboli syndrome after simvastatin. *Lancet*. 1998;351(9112):1331-1332. doi:10.1016/S0140-6736(05)79058-9
110. Desai M, Ram R, Prayaga A, Dakshinamurthy KV. Cholesterol crystal embolization (CCE): Improvement of renal function with high-dose corticosteroid treatment. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011;22(2):327-330.
111. Nakayama M, Izumaru K, Nagata M, et al. The effect of low-dose corticosteroids on short- and long-term renal outcome in patients with cholesterol crystal embolism. *Ren Fail*. 2011;33(3):298-306. doi:10.3109/0886022X.2011.560403
112. Keen RR, McCarthy WJ, Shireman PK, et al. Surgical management of atheroembolization. *J Vasc Surg*. 1995;21(5):773-781. doi:10.1016/s0741-5214(05)80008-4
113. Matchett WJ, McFarland DR, Eidt JF, Moursi MM. Blue toe syndrome: treatment with intra-arterial stents and review of therapies. *J Vasc Interv Radiol*. 2000;11(5):585-592. doi:10.1016/s1051-0443(07)61610-8
114. Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. *Blood*. 2021;137(21):2881-2889. doi:10.1182/blood.2020008951
115. Mutch NJ. Regulation of fibrinolysis by platelets. In: *Elsevier eBooks*. ; 2019:417-431. doi:10.1016/b978-0-12-813456-6.00023-0

116. Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, et al. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb Haemost.* 2002;87(3):493-501.
117. Bannach FG, Gutierrez A, Fowler BJ, et al. Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38579-38588. doi:10.1074/jbc.M202509200
118. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem.* 1990;265(11):6104-6111.
119. Gaffney PJ, Edgell TA, Whitton CM. The haemostatic balance -- Astrup revisited. *Haemostasis.* 1999;29(1):58-71. doi:10.1159/000022461
120. Gaffney PJ. Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:594-610.
121. Walker JB, Nesheim ME. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. *J Biol Chem.* 1999;274(8):5201-5212. doi:10.1074/jbc.274.8.5201
122. Lawrence PF, Goodman GR. Thrombolytic therapy. *Surg Clin North Am.* 1992;72(4):899-918. doi:10.1016/s0039-6109(16)45784-1
123. Kluff C, Sidelmann JJ, Gram JB. Assessing Safety of Thrombolytic Therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(3):300-310. doi:10.1055/s-0036-1584130
124. Brommer EJ. The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting as a determinant of the rate of fibrinolysis; inefficiency of activators added afterwards. *Thromb Res.* 1984;34(2):109-115. doi:10.1016/0049-3848(84)90067-7
125. Zamarron C, Lijnen HR, Collen D. Influence of exogenous and endogenous tissue-type plasminogen activator on the lysability of clots in a plasma milieu in vitro. *Thromb Res.* 1984;35(3):335-345. doi:10.1016/0049-3848(84)90364-5
126. Hoffmeister HM, Szabo S, Helber U, Seipel L. The thrombolytic paradox. *Thromb Res.* 2001;103 Suppl 1:S51-S55. doi:10.1016/s0049-3848(01)00297-3
127. Onundarson PT, Francis CW, Marder VJ. Depletion of plasminogen in vitro or during thrombolytic therapy limits fibrinolytic potential. *J Lab Clin Med.* 1992;120(1):120-128.
128. Onundarson PT, Haraldsson HM, Bergmann L, Francis CW, Marder VJ. Plasminogen depletion during streptokinase treatment or two-chain urokinase incubation correlates with decreased clot lysability ex vivo and in vitro. *Thromb Haemost.* 1993;70(6):998-1004.
129. Singh S, Houg AK, Wang D, Reed GL. Physiologic variations in blood plasminogen levels affect outcomes after acute cerebral thromboembolism in mice: a pathophysiologic role for microvascular thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2016;14(9):1822-1832. doi:10.1111/jth.13390
130. Lijnen HR, Carmeliet P, Bouché A, et al. Restoration of thrombolytic potential in plasminogen-deficient mice by bolus administration of plasminogen. *Blood.* 1996;88(3):870-876.
131. Sakharov DV, Rijken DC. Superficial accumulation of plasminogen during plasma clot lysis. *Circulation.* 1995;92(7):1883-1890. doi:10.1161/01.cir.92.7.1883
132. Anderle K, Fröhlich A. Review of studies with plasminogen concentrates and proposals for further therapeutic strategies with plasminogen concentrates. *Haemostasis.* 1988;18 Suppl 1:165-175. doi:10.1159/000215851

-
133. Kakkar VV, Scully MF. Intermittent plasminogen-streptokinase treatment of deep vein thrombosis. *Haemostasis*. 1988;18 Suppl 1:127-138. doi:10.1159/000215848
134. Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep*. 2012;1(3):185-190. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.012
135. Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci*. 2005;10:1754-1762. Published 2005 May 1. doi:10.2741/1658
136. Gong Y, Kim SO, Felez J, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19078-19083. doi:10.1074/jbc.M101387200
137. Miles LA, Castellino FJ, Gong Y. Critical role for conversion of glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(1):21-30. doi:10.1016/s1050-1738(02)00190-1
138. Zhang L, Gong Y, Grella DK, Castellino FJ, Miles LA. Endogenous plasmin converts Glu-plasminogen to Lys-plasminogen on the monocytoïd cell surface. *J Thromb Haemost*. 2003;1(6):1264-1270. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00155.x
139. Han J, Baik N, Kim KH, et al. Monoclonal antibodies detect receptor-induced binding sites in Glu-plasminogen. *Blood*. 2011;118(6):1653-1662. doi:10.1182/blood-2010-11-316943
140. Mehta JL, Chen L, Nichols WW, et al. Recombinant lys-plasminogen, but not glu-plasminogen, improves recombinant tissue-type plasminogen activator-induced coronary thrombolysis in dogs. *J Am Coll Cardiol*. 1995;25(3):753-760. doi:10.1016/0735-1097(94)00444-u
141. Scully MF, Kakkar VV. Measurement of degraded forms of plasminogen in human plasma. *Thromb Res*. 1980;17(3-4):347-352. doi:10.1016/0049-3848(80)90069-9
142. Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature*. 1978;272(5653):549-550. doi:10.1038/272549a0
143. Hattey E, Haumer M, Griffiths MR, Carroll V, Binder BR. Plasmin- α 2-antiplasmin complexes (plasmin—plasmin inhibitor complexes). In: *Springer eBooks*. ; 1999:265-274. doi:10.1007/978-94-011-4722-4_29
144. Latorre J, Foncuberta J, Rosendo A, Elez J. Eficacia trombolítica de la asociación Lis-plasminógeno y urokinasa: estudios en animales de experimentación y en el hombre [Thrombolytic efficacy of a Lys-plasminogen-urokinase combination: studies in experimental animals and humans]. *Angiologia*. 1990;42(6):218-226.
145. Lijnen HR, Nelles L, Van Hoef B, Demarsin E, Collen D. Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of amino acids 1 to 274 of tissue-type plasminogen activator and amino acids 138 to 411 of single-chain urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 1988;263(35):19083-19091.
146. Schreiber A, Shulhevich Y, Geraci S, et al. Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(5):F783-F788. doi:10.1152/ajprenal.00279.2012
147. Friedemann J, Heinrich R, Shulhevich Y, et al. Improved kinetic model for the transcutaneous measurement of glomerular filtration rate in experimental animals. *Kidney Int*. 2016;90(6):1377-1385. doi:10.1016/j.kint.2016.07.024

-
148. Ito Y, Tawada M, Yuasa H, Ryuzaki M. New Japanese Society of Dialysis Therapy Guidelines for Peritoneal Dialysis. *Contrib Nephrol.* 2019;198:52-61. doi:10.1159/000496523
149. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2020;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s09. Published 2020 Jan 13. doi:10.1590/1806-9282.66.S1.3
150. Drawz P, Rahman M. Chronic kidney disease. *Ann Intern Med.* 2015;162(11):ITC1-ITC16. doi:10.7326/AITC201506020
151. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5
152. Diethelm A, Vorburger C, Anabitar M, Haag E. Cholesterinkristall-Embolien infolge systemischer Thrombolysen eines akuten Myokardinfarkts [Cholesterol crystal embolisms due to systemic thrombolysis of an acute myocardial infarct]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1994;124(33):1437-1441.
153. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol.* 2015;5(4):1841-1875. Published 2015 Sep 20. doi:10.1002/cphy.c150006
154. Orellana-Urzuá S, Rojas I, Libano L, Rodrigo R. Pathophysiology of Ischemic Stroke: Role of Oxidative Stress. *Curr Pharm Des.* 2020;26(34):4246-4260. doi:10.2174/1381612826666200708133912
155. Falasca GF, Ramachandrala A, Kelley KA, O'Connor CR, Reginato AJ. Superoxide anion production and phagocytosis of crystals by cultured endothelial cells. *Arthritis Rheum.* 1993;36(1):105-116. doi:10.1002/art.1780360118
156. Nymo S, Niyonzima N, Espevik T, Mollnes TE. Cholesterol crystal-induced endothelial cell activation is complement-dependent and mediated by TNF. *Immunobiology.* 2014;219(10):786-792. doi:10.1016/j.imbio.2014.06.006
157. Asada Y, Yamashita A, Sato Y, Hatakeyama K. Thrombus Formation and Propagation in the Onset of Cardiovascular Events. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(8):653-664. doi:10.5551/jat.RV17022
158. Yang CT, Zuo M, Wang SJ, et al. Estimation on Formation Time of Thrombus. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2018;34(4):352-358. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2018.04.002
159. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445-3454. Published 2015 Jul 2. doi:10.2147/DDDT.S56071
160. De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Dis Model Mech.* 2020;13(11):dmm046565. Published 2020 Nov 18. doi:10.1242/dmm.046565
161. Tejada T, Tan L, Torres RA, et al. IGF-1 degradation by mouse mast cell protease 4 promotes cell death and adverse cardiac remodeling days after a myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(25):6949-6954. doi:10.1073/pnas.1603127113
162. Shimizu Y, Nicholson CK, Lambert JP, et al. Sodium Sulfide Attenuates Ischemic-Induced Heart Failure by Enhancing Proteasomal Function in an Nrf2-Dependent Manner. *Circ Heart Fail.* 2016;9(4):e002368. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002368

163. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM Jr, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H812-H838. doi:10.1152/ajpheart.00335.2017
164. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-177. doi:10.1093/eurheartj/ehx393
165. Wang J, Toan S, Zhou H. Mitochondrial quality control in cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury: New insights into the mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2020;156:104771. doi:10.1016/j.phrs.2020.104771
166. Bendary A, Tawfik W, Mahrous M, Salem M. Fibrinolytic therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Accelerated versus standard Streptokinase infusion regimen. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2017;9(4):209-214. doi:10.15171/jcvtr.2017.36
167. Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, et al. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation*. 2011;123(7):750-758. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.974675
168. Karpov AA, Vaulina DD, Smirnov SS, Moiseeva OM, Galagudza MM. Rodent models of pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Heliyon*. 2022;8(3):e09014. Published 2022 Feb 24. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09014
169. Zuin M, Piazza G, Barco S, et al. Time-based reperfusion in haemodynamically unstable pulmonary embolism patients: does early reperfusion therapy improve survival?. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2023;12(10):714-720. doi:10.1093/ehjacc/zuad080
170. Yu, Marione & Zhang, J.-S & Xiao, Y & Li, J.-K & Wang, H.-X. Thrombolytic effects at different time-window with urokinase in pig model of pulmonary embolism. 2007; 23. 620-622.
171. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism [published correction appears in *Eur Heart J*. 2015 Oct 14;36(39):2666] [published correction appears in *Eur Heart J*. 2015 Oct 14;36(39):2642]. *Eur Heart J*. 2014;35(43):3033-3069k. doi:10.1093/eurheartj/ehu283
172. Mulayamkuzhiyil Saju J, Leslie SW. Renal Infarction. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; March 10, 2024.
173. Silverberg D, Menes T, Rimon U, Salomon O, Halak M. Acute renal artery occlusion: Presentation, treatment, and outcome. *J Vasc Surg*. 2016;64(4):1026-1032. doi:10.1016/j.jvs.2016.04.043
174. Ouriel K, Andrus CH, Ricotta JJ, DeWeese JA, Green RM. Acute renal artery occlusion: when is revascularization justified?. *J Vasc Surg*. 1987;5(2):348-355. doi:10.1067/mva.1987.av0050348
175. Blum U, Billmann P, Krause T, et al. Effect of local low-dose thrombolysis on clinical outcome in acute embolic renal artery occlusion. *Radiology*. 1993;189(2):549-554. doi:10.1148/radiology.189.2.8210388
176. Marschner JA. Die Rolle von Pentraxin 3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen. 2019; doi: 10.5282/edoc.24477

177. Jensen SK, Heide-Jørgensen U, Vestergaard SV, et al. Kidney function before and after acute kidney injury: a nationwide population-based cohort study. *Clin Kidney J.* 2022;16(3):484-493. Published 2022 Nov 18. doi:10.1093/ckj/sfac247
178. Bouchardy B, Majno G. Histopathology of early myocardial infarcts. A new approach. *Am J Pathol.* 1974;74(2):301-330.
179. Ghafoor M, Kamal M, Nadeem U, Husain AN. Educational Case: Myocardial Infarction: Histopathology and Timing of Changes. *Acad Pathol.* 2020;7:2374289520976639. Published 2020 Dec 17. doi:10.1177/2374289520976639
180. Baig MU, Bodle J. Thrombolytic Therapy. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 28, 2023.
181. Robinson S, Nichols D, Macleod A, Duncan J. Acute renal artery embolism: a case report and brief literature review. *Ann Vasc Surg.* 2008;22(1):145-147. doi:10.1016/j.avsg.2007.07.029
182. Saeed K. Renal infarction. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2012;5:119-123. doi:10.2147/IJNRD.S33768
183. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association [published correction appears in *Stroke.* 2019 Dec;50(12):e440-e441]. *Stroke.* 2019;50(12):e344-e418. doi:10.1161/STR.0000000000000211
184. Dillon GM, Stevens S, Dusenbury WL, Massaro L, Toy F, Purdon B. Choosing the Correct "-ase" in Acute Ischemic Stroke: Alteplase, Tenecteplase, and Reteplase. *Adv Emerg Nurs J.* 2019;41(3):271-278. doi:10.1097/TME.0000000000000254
185. Huynh T, Cox JL, Massel D, et al. Predictors of intracranial hemorrhage with fibrinolytic therapy in unselected community patients: a report from the FASTRAK II project. *Am Heart J.* 2004;148(1):86-91. doi:10.1016/j.ahj.2004.02.006
186. Fiumara K, Kucher N, Fanikos J, Goldhaber SZ. Predictors of major hemorrhage following fibrinolysis for acute pulmonary embolism. *Am J Cardiol.* 2006;97(1):127-129. doi:10.1016/j.amjcard.2005.07.117
187. Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet.* 2014;384(9958):1929-1935. doi:10.1016/S0140-6736(14)60584-5
188. Dong MX, Hu QC, Shen P, et al. Recombinant Tissue Plasminogen Activator Induces Neurological Side Effects Independent on Thrombolysis in Mechanical Animal Models of Focal Cerebral Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158848. Published 2016 Jul 7. doi:10.1371/journal.pone.0158848
189. Lawton JS, Tamis-Holland JE, Bangalore S, et al. 2021 ACC/AHA/SCAI Guideline for Coronary Artery Revascularization: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines [published correction appears in *Circulation.* 2022 Mar 15;145(11):e771]. *Circulation.* 2022;145(3):e4-e17. doi:10.1161/CIR.0000000000001039

-
190. Zhang H, Cui YC, Tian Y, et al. A novel model for evaluating thrombolytic therapy in dogs with ST-elevation myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16:21. Published 2016 Jan 25. doi:10.1186/s12872-016-0194-6
191. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report [published correction appears in *Chest.* 2016 Oct;150(4):988]. *Chest.* 2016;149(2):315-352. doi:10.1016/j.chest.2015.11.026
192. Marti C, John G, Konstantinides S, et al. Systemic thrombolytic therapy for acute pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J.* 2015;36(10):605-614. doi:10.1093/eurheartj/ehu218
193. Shi Y, Zhang Z, Cai D, et al. Urokinase Attenuates Pulmonary Thromboembolism in an Animal Model by Inhibition of Inflammatory Response. *J Immunol Res.* 2018;2018:6941368. Published 2018 Dec 25. doi:10.1155/2018/6941368
194. Kumar SS, Sabu A. Fibrinolytic Enzymes for Thrombolytic Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1148:345-381. doi:10.1007/978-981-13-7709-9_15
195. Kwaan HC. From fibrinolysis to the plasminogen-plasmin system and beyond: a remarkable growth of knowledge, with personal observations on the history of fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(5):585-591. doi:10.1055/s-0034-1383545
196. Mukhopadhyay S, Johnson TA, Duru N, et al. Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution. *Front Immunol.* 2019;10:1348. Published 2019 Jun 14. doi:10.3389/fimmu.2019.01348
197. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45. doi:10.1038/nri3345
198. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature.* 2008;451(7181):914-918. doi:10.1038/nature06797
199. Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, et al. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med.* 1997;185(5):963-968. doi:10.1084/jem.185.5.963
200. Malliaros J, Holdsworth SR, Wojta J, Erlich J, Tipping PG. Glomerular fibrinolytic activity in anti-GBM glomerulonephritis in rabbits. *Kidney Int.* 1993;44(3):557-564. doi:10.1038/ki.1993.281
201. Becker GJ, Hewitson TD. Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(10):2432-2438. doi:10.1093/ndt/gft071
202. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276(6):618-632. doi:10.1111/joim.12296

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und während meiner gesamten Forschungszeit unterstützt hat. Ich möchte mich bei ihm für die Chance bedanken, eine Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen und an einem spannenden Thema forschen zu können.

Weiterhin ein großer Dank gilt Frau Chongxu Shi, die mich während meiner ersten Monaten in das Team der AG Anders eingearbeitet und mich in die verschiedenen Methoden des wissenschaftlichen Arbeitens eingelehrt hat. Ebenso möchte ich mich bei Frau Danyang Zhao für ihre Hilfe bei den Experimenten von Teilstudie 4 dieses Projekts bedanken. Weiterhin danke ich Frau Janina Mandelbaum und Frau Anna Afimadou für ihre technische Unterstützung in der Histologie. Ich danke auch den Mitarbeitern von PreviPharma Consulting GmbH für die gute Zusammenarbeit und für die Möglichkeit, an diesem Forschungsprojekt teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann danke ich für die Aufnahme und Förderung im „FöFoLe“- Programm.

Zuletzt gilt mein Dank allen nicht namentlich Mitarbeitern des Labors und meinen Mitdoktoranden für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, sowie meiner Familie, die mir während dieser Zeit zur Seite stand und mich unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Lyubenov, Lyuben

Name, Vorname

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

Der Effekt vom intravenösen Glu-Plasminogen auf Cholesterinkristallemboliebedingte thrombotische Angiopathie und akute Nierenschädigung

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.

München, 03.06.2024

Ort, Datum

Unterschrift Lyuben Lyubenov

Publikationsverzeichnis

1. Lyubenov L, Shi C, Zhao D, Yang L, Lei Y, Mammadova-Bach E, de Chiara L, Semeraro R, Landini S, Romagnani P, Vörg E, Devarapu SK, Welz R, Kiessig ST, Anders HJ. Intravenous Glu-plasminogen attenuates cholesterol crystal embolism-induced thrombotic angiopathy, acute kidney injury and kidney infarction. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 Jan 23;38(1):93-105. doi: 10.1093/ndt/gfac273. Erratum in: *Nephrol Dial Transplant*. 2023 Jul 12;; PMID: 36102665.
2. Shi C, Zhao D, Lyubenov L, Motrapu M, Li N, Steiger S, Mammadova-Bach E, Yang L, Liu D, Anders HJ. Neutrophil circadian rhythm is associated with different outcomes of acute kidney injury due to cholesterol crystal embolism. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Jul 28;9:974759. doi: 10.3389/fcvm.2022.974759. PMID: 35966530; PMCID: PMC9366331.