

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Die Rolle der mikroRNAs miR-193a-5p, miR-34a-5p, miR-194-5p
und miR-378a-3p als prädiktive Marker für die Erholung der
Nierenfunktion nach akuter Nierenschädigung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Manon Schieß
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: PD Dr. med. Timo Brandenburger

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Udo Boeken

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit.

ZUSAMMENFASSUNG (deutsch)

Die akute Nierenschädigung (*kidney injury*, AKI) ist bei Patienten auf der Intensivstation eine häufige und schwerwiegende Komplikation, die mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einhergeht. Sowohl prädiktive Marker für eine Erholung als auch Therapieoptionen bei AKI sind begrenzt. MikroRNAs (miRNAs) gelten als potenziell prädiktive Biomarker in der Pathophysiologie der Niere und können eine große Rolle in der zukünftigen Prävention und Therapie von AKI spielen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob miRNAs im Blut von Patienten mit höhergradiger AKI als prädiktive Marker für eine Erholung der Nierenfunktion dienen können.

Es wurden Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf mit höhergradiger AKI (AKI 2 oder 3) eingeschlossen. An vier Zeitpunkten wurden Blut- und Urinproben gewonnen. Studienrelevante Daten wurden in pseudonymisierter Form dokumentiert. Die Patienten wurden anhand des Verlaufs des Serumkreatinins innerhalb von 7 Tagen in zwei Gruppen eingeteilt: in eine Gruppe ohne Erholung und in eine Gruppe mit früher Erholung der Nierenfunktion nach AKI. Mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) wurde untersucht, ob Unterschiede in der Expression von Plasma-miRNAs in den zwei Gruppen vorliegen. Durch Netzwerkanalysen wurden die miRNAs mit Proteinen und biologischen Prozessen in Verbindung gebracht, die mit akuter Nierenschädigung assoziiert sind. Vier relevante miRNAs wurden auf Grundlage der Netzwerkanalysen, des Expressionsgrades und der Expressionsunterschiede im Plasma zwischen den Gruppen ausgewählt. Anhand von quantitativer PCR (qPCR) wurden die Expressionsunterschiede dieser miRNAs in den beiden Gruppen analysiert.

Von 71 eingeschlossenen Patienten persistierte bei 53 Patienten die Nierenschädigung, 18 Patienten erholten sich innerhalb der ersten sieben Tage nach AKI. Im NGS wurden 26 differentiell exprimierte miRNAs gefunden. Bei den Patienten ohne Erholung nach AKI waren die vier ausgewählten miRNAs am ersten Tag in der qPCR vermehrt exprimiert; am 7. Tag nach AKI bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der miRNA-Expression in den beiden Gruppen.

MiRNAs sind vor allem in der frühen Phase im Plasma von Patienten mit AKI differentiell exprimiert. Dies ist vor allem für den Transfer in den klinischen Alltag interessant, da Therapieentscheidungen, wie beispielsweise ein früher Dialysebeginn, durch diese neuen Biomarker beeinflusst werden könnten.

Zusammenfassend könnten miRNAs bei Patienten mit höhergradiger AKI als frühe prädiktive Marker für eine Erholung der Nierenfunktion dienen.

Zusammenfassung (englisch)

Acute kidney injury (AKI) is a common and serious complication concerning patients on intensive care units, which is accompanied by an elevated morbidity and mortality. Predictive biomarkers for recovery as well as therapeutic options for AKI are limited. MicroRNAs (miRNAs) are discussed as potential predictive biomarkers in the kidney's pathophysiology and might play a significant role in future prevention and therapy of AKI.

In this work it was investigated if miRNAs in patients' blood with higher grades of AKI can serve as predictive markers for the recovery of the kidney function.

Patients treated on the interdisciplinary operative intensive care unit at the University Hospital Duesseldorf with higher stages of AKI (AKI 2 or 3) were included. Blood and urine samples were collected at 4 different points in time.

Relevant data were documented in pseudonymized form. According to the development of serum creatinine within 7 days the patients were divided into two groups: in a group without renal recovery and in another group with early renal recovery after AKI. By using Next Generation Sequencing (NGS) it was investigated if there is a differential expression of plasma miRNAs between the two groups. Networkanalyses connected miRNAs with proteins and biological processes that are associated with acute kidney injury.

Based on the networkanalyses, the grade of expression and the differential expression of plasma miRNAs between the two groups, four relevant miRNAs were chosen. By using quantitative PCR (qPCR) differences in the expression of these miRNAs between the two groups were analyzed.

Of the 71 included patients, 53 patients had a persistent kidney injury, 18 patients recovered from AKI within seven days. Using NGS, 26 differentially expressed miRNAs were found. In patients without recovery after AKI the four chosen miRNAs were highly expressed during qPCR on the first day after AKI diagnosis. On the 7th day after AKI there was no significant difference in the expression of miRNAs between the two groups.

Especially in the early phase after kidney injury the level of miRNAs in the plasma of patients with AKI are differentially expressed. This is highly interesting for the transfer in the daily clinical setting, since these new biomarkers might influence therapeutical decisions, such as an earlier start on renal replacement therapy.

In summary, miRNAs in patients with higher grades of AKI could serve as early predictive markers for renal recovery

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADQI	<i>Acute Dialysis Quality Initiative</i>
AGO2	Argonaut 2
AKD	<i>acute kidney disease</i>
AKI	<i>acute kidney injury</i>
AKIKI	<i>Artificial Kidney Initiation in Kidney Injury</i>
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ARF	<i>acute renal failure</i>
ATN	<i>Acute Renal Failure Trial Network</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
BGA	Blutgasanalyse
BigpAK	<i>Biomarker-guided Intervention to prevent Acute Kidney Injury After Major Surgery</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bzw.	beziehungsweise
CCL 14	<i>C–C motif chemokine ligand 14</i>
CKD	<i>chronic kidney disease</i>
circRNA	<i>circular RNA</i>
CRF	<i>case report file</i>
CRP	C-reaktives Protein
COPD	chronisch obstructive Lungenerkrankung
CSA-AKI	<i>cardiac-surgery associated acute kidney injury</i>
CysC	Cystatin C
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECLS	<i>Extracorporeal Life Support System</i>
ESRD	<i>End Stage Renal Disease</i>
et al.	et alii
FDR	<i>false discovery rate</i>

FINNAKI	<i>Incidence, risk factors and 90-day mortality of patients with Acute Kidney Injury in Finnish intensive care units</i>
FiO₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
h	<i>hour, Stunde</i>
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
IDEAL-ICU	<i>Initiation of Dialysis Early Versus Delayed in the Intensive Care Unit</i>
IGFBP-7	<i>insulin-like-growth factor-binding protein</i>
IL-6	Interleukin-6
IRI	Ischämie-Reperusionsverletzungen
kDA	Kilodalton
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIM-1	<i>kidney injury molecule 1</i>
lncRNS	<i>long noncoding RNA</i>
m²	Quadratmeter
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAKE	<i>Major Adverse Kidney Event</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	mikroRNA
MIGQ	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
mtRNA	mitochondriale RNA
NAG	<i>N-acetyl-β-D-glucosaminidase</i>
ncRNA	nicht-kodierende RNA; <i>non-coding RNA</i>
ng	Nanogramm
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>

NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
paO₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
paCO₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PCT	Procalcitonin
piRNA	<i>piwi-interacting Ribonucleic acid</i>
pre-miRNA	<i>Precursor-micro-Ribonukleinsäure</i>
pri-miRNA	primäre mikro-Ribonukleinsäure
pTT	partielle Thromboplastinzeit
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
raSiRNA	<i>repeat-associated small RNA</i>
RENAL	<i>The Randomized Evaluation of Normal versus Augmented Level Replacement Therapy Study</i>
RIFLE	<i>Risk – Injury – Failure – Loss – End Stage Renal Disease</i>
RISC	<i>microRNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RT	Reverse Transkription
RRT	<i>Renal Replacement Therapy</i>
scaRNA	<i>small cajal body-specific RNA</i>
SCr	Serum-Kreatinin
SD	<i>standard deviation, Standardabweichung</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
sniRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
TIMP2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
tiRNA	<i>transfer RNA-derived stress-induced RNA</i>
TMM	<i>Trimmed Mean of M-values Normalization Method</i>
TPM	<i>Transcripts Per Million mapped reads</i>
tRNA	transfer RNA
UMI	<i>Unique Molecular Identifier</i>
UTR	untranslatierte Region
vs.	versus

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Akute Nierenschädigung.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Pathophysiologie	2
1.1.4 Biomarker	4
1.1.5 Prävention und Therapie	6
1.1.6 Renale Erholung.....	7
1.2 Nichtkodierende RNAs.....	9
1.2.1 Definition und Synthese von miRNAs.....	10
1.2.2 Bindung von miRNAs an ihre Zielstruktur.....	12
1.2.3 MiRNAs bei pathologischen Prozessen.....	12
1.2.4 MiRNAs bei akuter Nierenschädigung.....	12
1.2.5 MiRNAs als diagnostische und therapeutische Marker.....	13
1.3 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Studienaufbau.....	16
2.2 Material	17
2.2.1 Materialien für die Probengewinnung und Asservierung.....	17
2.2.2 Geräte.....	18
2.2.3 Software	18
2.3 Erfassung klinischer Daten in <i>Case Report Files</i>	18
2.3.1 Patientencharakteristika	18
2.3.2 Säure-Base-Haushalt und Elektrolyte.....	19
2.3.3 Laborparameter und klinische Daten.....	19
2.3.4 Klinische Scores	20
2.3.5 Stationärer Verlauf.....	20
2.3.6 Nachbeobachtung.....	21
2.3.7 Definition einer frühen Erholung nach AKI.....	21
2.4 Statistische Methoden zur Auswertung der CRFs.....	22
2.5 Experimentelle Versuche	22
2.5.1 <i>Next Generation Sequencing</i>	22
2.5.2 Netzwerkanalysen	25

2.5.3	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	26
3	Ergebnisse	29
3.1	Patientenkollektiv	29
3.2	Demographische und klinische Daten.....	32
3.2.1	Patientencharakteristika	32
3.2.2	Blutgasanalysen, Elektrolyte und Säure-Base-Haushalt.....	35
3.2.3	Laborparameter	37
3.2.4	Klinische Scores	45
3.2.5	Stationärer Verlauf.....	46
3.2.6	Nachbeobachtung.....	49
3.3	Analyse differentiell exprimierter miRNAs mithilfe des <i>Next Generation Sequencing</i>	57
3.4	Netzwerkanalysen.....	61
3.5	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	64
4	Diskussion.....	71
4.1	Methodik	71
4.1.1	Studiendesign	71
4.1.2	Definition von AKI und renaler Erholung.....	73
4.1.3	CRF	74
4.1.4	NGS.....	74
4.1.5	qRT-PCR	75
4.2	Ergebnisse	77
4.2.1	Klinische Daten.....	77
4.2.2	MiR-378a-3p, miR-194-5p, miR 34a-5p und miR-193a-5p als Biomarker der Erholung.....	85
4.3	Ausblicke	90
4.4	Schlussfolgerungen	90
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	92
	Danksagungen	101

1 Einleitung

1.1 Akute Nierenschädigung

1.1.1 Definition

Die akute Nierenschädigung (*acute kidney injury*, AKI) ist eine akute Verschlechterung der Nierenfunktion, die innerhalb weniger Stunden bis Tage auftritt und potenziell reversibel ist [1]. Über viele Jahre führte eine fehlende einheitliche Definition für eine AKI zu einer erschwerten Diagnosestellung. Die in den letzten Jahren publizierten einheitlichen Kriterien RIFLE (*Risk – Injury – Failure – Loss – End Stage Renal Disease*, 2004) [2], AKIN (*Acute Kidney Injury Network*, 2007) [3] und KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, 2012) [4] orientieren sich zur Definition der AKI am Serum-Kreatinin (SCr) sowie an der ausgeschiedenen Urinmenge. Die *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) veröffentlichte 2004 die RIFLE-Kriterien [2] für die Klassifizierung eines Nierenschadens. Die ersten drei Buchstaben stehen dabei für den zunehmenden Schweregrad der Nierenschädigung; *Risk* (Risiko), *Injury* (Schädigung) und *Failure* (Versagen). Die letzten beiden Buchstaben klassifizieren das *Outcome* der Schädigung bzw. die Dauer der Nierenschädigung. Eine Nierenschädigung, die länger als 4 Wochen anhält wird als *Loss* (Verlust) bezeichnet; eine akute Nierenschädigung, die länger als 3 Monate anhält, wird als *End Stage Renal Disease* (terminale Niereninsuffizienz) definiert [2]. In der aktuellen Definition der AKI in den *KDIGO-Guidelines* wird der Schweregrad der Nierenschädigung in drei Stadien eingeteilt [4]. Die Einteilung erfolgt anhand eines Anstiegs des SCr sowie einer reduzierten Urinproduktion. Zusätzlich berücksichtigt wird der Beginn eines Nierenersatzverfahrens und bei Patienten unter 18 Jahren eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die Einteilung anhand der *KDIGO-Guidelines* vereint die AKIN- und RIFLE-Kriterien (Tabelle 1). Ein länger als 7 Tage anhaltendes AKI wird als akute Nierenerkrankung (*acute kidney disease*, AKD) bezeichnet [5]. Der Begriff AKI hat in den letzten Jahren die einst geläufige Bezeichnung des akuten Nierenversagens (*acute renal failure*, ARF) zunehmend abgelöst, da bereits kleine Einschränkungen der Nierenfunktion einen Einfluss auf die Mortalitätsrate haben können [4]. Somit fasst der Begriff der AKI ein

größeres Spektrum der Nierenschädigung zusammen; von der geringen Funktionseinschränkung der Niere bis hin zur Dialysepflichtigkeit.

AKI-Stadium	Serum-Kreatinin	Urin-Ausscheidung
1	1,5- bis 1,9-facher Kreatininanstieg innerhalb von 7 Tagen <i>oder</i> Anstieg $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48h	< 0,5 ml/ kg KG/ h über mehr als 6h
2	2,0- bis 2,9-facher Kreatininanstieg	< 0,5ml/ kg KG/ h über mehr als 12h
3	≥ 3 -facher Kreatininanstieg <i>oder</i> ≥ 4 mg/dl mit einem akuten Anstieg $\geq 0,5$ mg/dl <i>oder</i> Initiation einer Nierenersatztherapie <i>oder</i> bei Patienten < 18 Jahre: Verminderung der GFR auf < 35 ml/ min pro 1,73 m ²	< 0,3 ml/ kg KG/ h über mehr als 24h <i>oder</i> fehlende Urinausscheidung für ≥ 12 h

Tabelle 1: Einteilung der AKI-Stadien

In der Tabelle abgebildet sind die drei AKI-Stadien modifiziert nach den KDIGO-*Guidelines* [4]. AKI = *acute kidney injury*; GFR = glomeruläre Filtrationsrate; h = Stunde; mg/dl = Milligramm/Deziliter; ml/kg KG/h = Milliliter/ Kilogramm Körpergewicht/ Stunde; m² = Quadratmeter

1.1.2 Epidemiologie

AKI stellt in der perioperativen Versorgung sowie auf der Intensivstation ein häufiges Problem dar [6]. Bis zu 20 % aller Hospitalisationen werden durch eine AKI verkompliziert [7] und bis zu 40 % aller kritisch kranken Patienten sind betroffen [8]. AKI erhöht das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sowie für die Entstehung eines chronischen Nierenversagens (*chronic kidney disease*, CKD) und ist mit einem verlängerten Krankenhausaufenthalt und erhöhter Mortalität assoziiert [7, 9-13]. Das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sowie der Schweregrad der AKI korrelieren mit der Mortalitätsrate [10, 14]. Die Mortalitätsrate beträgt in Beobachtungsstudien zwischen 40-50 % mit steigender Rate bei dialysepflichtigen Patienten [15-17].

1.1.3 Pathophysiologie

Der Entwicklung der AKI liegen verschiedenste pathophysiologische Mechanismen zu Grunde. Hämodynamische Instabilität, Endotheldysfunktion,

Veränderungen der Mikrozirkulation sowie intrarenale Entzündungen treten oft zeitgleich auf und führen zu einer Einschränkung der Nierenfunktion [6]. In der FINNAKI-Studie wurde die Inzidenz, Risikofaktoren und die Mortalität von AKI auf finnischen Intensivstationen untersucht [18]. Es konnte gezeigt werden, dass hypotensive Episoden bei Patienten mit Sepsis mit einem Fortschreiten einer AKI assoziiert sind. Bereits kurze intraoperativ hypotensive Episoden können das Risiko für eine Nierenschädigung erhöhen [19]. Die Entstehung der AKI ist multifaktoriell, die Hauptursachen sind Sepsis, Ischämie, hämodynamische Instabilität, große chirurgische Eingriffe und medikamenteninduzierte Nephrotoxizität [4, 12, 20, 21]. Neben diesen häufigen Expositionen sind seltenere Ursachen wie Verbrennungen und Trauma sowie Risikofaktoren für die Entwicklung einer AKI in den KDIGO-*Guidelines* zusammengefasst [4] (Tabelle 2). Prädispositionen sind ein Diabetes mellitus, das weibliche Geschlecht, chronische Erkrankungen und maligne Tumorerkrankungen [4]. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AKI besteht bei Patienten mit steigendem Alter und vorbestehender chronischer Nierenerkrankung [7].

Exposition	Prädisposition
Sepsis	Dehydratation oder Volumenmangel
Kritische Erkrankung	Fortgeschrittenes Alter
Kreislaufschock	Weibliches Geschlecht
Verbrennung	Schwarze Hautfarbe
Trauma	CKD
Kardiologische Operation (vor allem mit kardiopulmonalem Bypass)	Chronische Erkrankung (Herz, Leber, Lunge)
Große nicht-kardiologische Operation	Diabetes mellitus
Nephrotoxische Medikamente	Krebs
Kontrastmittel	Anämie
Tierische und pflanzliche Gifte	

Tabelle 2: Expositionen und Prädispositionen für eine AKI (*acute kidney injury*)

Die Tabelle wurde modifiziert nach den KDIGO-*Guidelines* [4]

CKD = *chronic kidney disease*

Es besteht ein bidirektionaler Zusammenhang zwischen CKD und AKI; AKI kann das Fortschreiten einer vorbestehenden CKD unterstützen und ein chronischer Nierenschaden gilt als Risikofaktor für AKI [22, 23]. AKI schreitet nicht immer bis

zum vollständigen Funktionsverlust der Niere mit der Notwendigkeit einer Dialyse fort, doch schon ein geringer Anstieg des SCr erhöht die Mortalität [24]. Im Rahmen der AKI kommt es zum Verlust der renalen Exkretionsfunktion mit einer Akkumulation von Produkten aus dem Harnstoffzyklus sowie anderen Abfallprodukten [12]. Es folgt eine Reduktion der Urinproduktion sowie ein Anstieg metabolischer Säuren, des Kalium- und des Phosphatspiegels [12].

1.1.4 Biomarker

Zur Einschätzung der Nierenfunktion werden im klinischen Alltag meist das SCr, die GFR und die ausgeschiedene Urinmenge verwendet. Diese spiegeln zwar die Nierenfunktion wieder, sind aber keine Marker für einen Nierenschaden [25]. Die GFR spiegelt zudem die reduzierte Nierenfunktion erst spät wieder, da die gesunden Nephrons durch Hyperfiltration und Hypertrophie für eine lange Zeit die funktionslosen Nephrons ausgleichen können [26]. Auch das SCr steigt erst an, wenn bereits 50 % der Nephrons ausgefallen sind [26] und ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Muskelmasse [27]. So kann bei gesunden Sportlern ohne Nierenschaden das SCr erhöht sein oder bei kritisch kranken Patienten mit reduzierter Muskelmasse unzureichend ansteigen trotz eines ausgeprägten Nierenschadens. Die ausgeschiedene Urinmenge schwankt abhängig vom Volumenstatus sowie Diuretika-Applikationen, ohne dabei die Nierenfunktion korrekt widerzuspiegeln [28]. Da diese Unzulänglichkeiten in der Verwendung des SCr, der GFR sowie der Urinausscheidung als Marker für einen Nierenschaden lange bekannt sind, konzentrieren sich viele aktuelle Forschungsprojekte auf die Suche nach neuen verlässlichen Biomarkern [29-31]. Ziel dieser neuen Biomarker ist vor allem eine frühzeitige AKI-Diagnosestellung, die Einschätzung des Schweregrads der Schädigung sowie das Erkennen einer Erholung nach AKI. Einige der neuen vielversprechenden Biomarker aus Urin und Plasma sind Cystatin C (CysC), *Neutrophil gelatinase associated lipocalin* (NGAL), *kidney injury molecule 1* (KIM-1), *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP-2), *insulin-like-growth factor-binding protein 7* (IGFBP-7) sowie mikroRibonukleinsäuren (miRNAs).

CysC ist ein wichtiger extrazellulärer Cystein-Protease-Inhibitor, dessen Serum-Konzentration unabhängig von Patienteneigenschaften wie Alter, Geschlecht oder Gewicht zu sein scheint [32]. Bei Patienten mit tubulärer Dysfunktion ist CysC im Urin erhöht [33] und gilt ebenfalls als sensitiver Serum-Marker der GFR mit prädiktivem Wert zur Vorhersage von Mortalität sowie unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen [34].

NGAL ist ein 25 Kilodalton (kDa)-Protein, das durch seine bakteriostatische Wirkung eine große Rolle im angeborenen Immunsystem spielt [35]. Es wird von geschädigten Epithelzellen sezerniert und steigt nach ischämischer oder toxischer Nierenschädigung innerhalb weniger Stunden im Urin stark an [30, 36]. NGAL im Urin und im Plasma steigt proportional zum Schweregrad des Nierenschadens an [37, 38]. Bei Kindern und Erwachsenen mit AKI nach kardiochirurgischen Eingriffen ist NGAL bereits 2-3 Stunden nach kardiopulmonalem Bypass im Urin erhöht; Patienten ohne AKI bieten keine erhöhte NGAL-Expression [30, 39]. Eine gesteigerte NGAL-Expression, auch ohne einen Anstieg des SCr, erhöht das Risiko für unerwünschte Ereignisse, wie Tod oder Dialysepflichtigkeit [37].

KIM-1 ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domäne [40]. Es wird in der gesunden Niere zu einem geringen Level produziert, die Expression steigt jedoch in der postischämischen Niere sowie nach medikamenteninduzierter AKI bei Nagetieren drastisch an [41, 42]. Beim Menschen kann KIM-1 als Biomarker nachweisbar im Urin einen proximalen Tubulusschaden der Niere widerspiegeln [43]. Liangos et alii (et al.) demonstrierten in einer Studie mit 201 Patienten mit AKI, dass eine Hochregulation von KIM-1 und *N-acetyl-β-D-glucosaminidase* (NAG) im Urin mit einer erhöhten Mortalität und Dialysepflichtigkeit assoziiert ist [44]. KIM-1 wird als potenzieller Marker für eine Regeneration nach toxischem oder ischämischen Nierenschaden diskutiert [45]. Für eine frühzeitige Erkennung einer Nephrotoxizität von Medikamenten wurde KIM-1 als Biomarker von der amerikanischen *Federal Drug Administration* (FDA) anerkannt [46].

TIMP-2 und IGFBP-7 werden als sogenannte *cell cycle arrest marker* nach einem ischämischen oder toxischen DNA-Schaden in tubulären Zellen exprimiert [32].

Bei einem Zellschaden stoppen TIMP-2 und IGFBP-7 den Zellzyklus in der G1-Phase [47], um so möglicherweise die Folgeschäden einer AKI zu limitieren [48]. Kashani et al. demonstrierten 2013 in zwei multizentrischen Beobachtungsstudien, dass das Produkt aus der TIMP-2- und IGFBP-7-Konzentration mit einer *area under the curve* (AUC) von 0.8 vielen anderen bisher beschriebenen Biomarkern (z.B. NGAL, CysC, KIM-1) bei der Prädiktion von AKI überlegen ist [47]. Meersch et al. zeigten, dass bereits 4 Stunden nach kardiochirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass das Produkt aus TIMP-2 und IGFBP-7 im Urin von Patienten mit AKI deutlich erhöht war; die AKI-Diagnosestellung anhand des SCr konnte erst 1-3 Tage nach der Operation erfolgen [49].

1.1.5 Prävention und Therapie

Bei unzureichenden Therapieoptionen folgt bei einer fortgeschrittenen AKI häufig die Nierenersatztherapie (*renal replacement therapy, RRT*) als Organersatz; 10-20 % aller Patienten auf der Intensivstation benötigen eine RRT [11]. Die KDIGO-*Guidelines* empfehlen den sofortigen Beginn einer Nierenersatztherapie bei lebensbedrohlichen Umständen wie Hyperkaliämie, Azidose, urämischen Komplikationen oder Lungenödem durch Volumenüberladung [50]. In zwei großen Studien zur Untersuchung von Strategien des Nierenersatzverfahrens, ATN und RENAL [51, 52], wurde untersucht, ob die Dialyseintensität das Outcome von AKI-Patienten beeinflusst; in beiden Studien konnte eine intensivierete Dialysetherapie die Mortalitätsrate nicht reduzieren. In der STARRT-AKI-Studie [53] wurde untersucht, ob ein früher Dialysebeginn bei Patienten mit AKI die 90-Tages-Mortalität verringern kann. Verglichen wurde die 90-Tages Mortalität zwischen einer Gruppe mit Standardvorgehen (Dialysebeginn beim Vorliegen von konventionellen Indikationen) und einer Gruppe mit beschleunigtem Dialysebeginn innerhalb von 12 Stunden. Die Ergebnisse zeigten, dass ein beschleunigter Dialysebeginn nicht mit einer geringeren 90-Tages-Mortalität assoziiert war [53]. Ähnliche Ergebnisse zeigte die IDEAL-ICU-Studie an Patienten mit AKI im septischen Schock [54]. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der 90-Tages-Mortalitätsrate bei Patienten mit frühem versus spätem Dialysebeginn festgestellt werden. Auch in der AKIKI-

Studie war ein früher Dialysebeginn bei Patienten mit AKI und septischen Schock oder mit *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) nicht mit einer verbesserten 60-Tages-Mortalität assoziiert [55]. Viele Intensivmediziner stehen häufig vor der Entscheidung, auch ohne lebensbedrohliche Umstände ein Nierenersatzverfahren zu beginnen und die Art und Dosis der Dialysetherapie variiert stark nach Erfahrungen und Standards des jeweiligen Zentrums. Zwar ist der Anteil der kritisch kranken Patienten, die eine RRT benötigen, und somit auch die klinische Erfahrung in den letzten Jahren deutlich gestiegen [56], trotzdem bleiben einige Frage zur Dosierung und zum Zeitpunkt des RRT-Beginns sowie der Beendigung der Therapie bisher ungeklärt [57]. Die Früherkennung der AKI sowie Präventionsmaßnahmen sind demnach von großer Bedeutung. Das Hauptprinzip der AKI-Prävention liegt in der Ursachen- bzw. Triggerbeseitigung [12]. In den KDIGO-*Guidelines* von 2012 werden Präventionsmaßnahmen als sog. *Bundles* zusammengefasst [58]. In diesen wird ein strenges Monitoring der Hämodynamik und des Volumenhaushaltes, eine regelmäßige Kontrolle des SCr und der Urinausscheidung, der Verzicht auf nephrotoxische Substanzen sowie eine Normoglykämie empfohlen [58]. Zudem sollten Volumendefizite mit Kristalloiden aufgefüllt werden, Kolloidale wie z.B. Hydroxyethylstärke sollten vermieden werden [59]. In der BigpAK-Studie von Gocze et al. [60] wurde untersucht, ob eine Biomarker-gesteuerte Anwendung der KDIGO-Empfehlungen zur AKI-Prävention nach großen operativen Eingriffen dienen kann [60]. Ein erhöhtes AKI-Risiko wurde anhand des Produkts der TIMP-2- und IGFBP-7-Konzentration aus dem Urin detektiert. Die Hälfte der AKI-Risikopatienten erhielt eine strikte Therapie anhand der KDIGO-*Bundles* (frühe Volumenoptimierung, frühzeitige Aufrechterhaltung des Perfusionsdruck sowie Verzicht auf nephrotoxische Substanzen) [58], die andere Hälfte der Patienten erhielt eine normale Standardtherapie. Die Interventionsgruppe zeigte eine signifikant reduzierte AKI-Inzidenz, der Krankenhaus- sowie Intensivaufenthalt waren signifikant verkürzt und die Kosten konnten reduziert werden [60].

1.1.6 Renale Erholung

AKI gilt als potenziell reversible Einschränkung der Nierenfunktion. Die Erholung der Nierenfunktion ist dabei insbesondere abhängig vom Alter der Patienten, der

vorher bestehenden Nierenfunktion sowie der Dauer und dem Schweregrad der AKI [23]. Eine einheitliche Definition der Erholung nach AKI gibt es aktuell nicht. Die Erholung wird häufig als Unabhängigkeit von der Nierenersatztherapie definiert; eine vollständige Erholung ist häufig definiert als die Abwesenheit der AKI-Kriterien mit einer Rückkehr zum *Baseline*-Serumkreatinin (*Baseline*-SCr); eine partielle Erholung wird oft als ein Rückgang des AKI-Stadiums definiert [61]. Um den Schweregrad einer AKI klassifizieren zu können und um relative und absolute Änderung der SCr-Werte beurteilen zu können, muss ein SCr-Ausgangswert bekannt sein; das *Baseline*-SCr. Auch um die Erholung nach AKI beurteilen zu können müssen im Vorfeld Ausgangswerte der Nierenfunktion erfasst werden, um eine ausbleibende Erholung von einer vorbestehenden CKD unterscheiden zu können [61]. Häufig wird dazu das *Baseline*-SCr verwendet, welches idealerweise in den 3-12 Monaten vor AKI erfasst wurde [62], jedoch liegt dies oft nicht vor bzw. wurde im Vorfeld nicht erfasst. Anhand der RIFLE-Kriterien wird als ausbleibende Erholung bzw. Verlust der Nierenfunktion als ein kompletter Funktionsverlust der Niere für mehr als 4 Wochen definiert; ESRD erreichen Patienten mit einem Funktionsverlust für mehr als 3 Monate nach AKI [2]. Die Verwendung des SCr als Erholungsparameter kann zu Fehleinschätzungen führen. So kann beispielsweise bei Patienten mit unbekanntem *Baseline*-SCr eine Erholung unerkannt bleiben, wenn der Patient bereits vor der Nierenschädigung ein unentdeckt erhöhtes *Baseline*-SCr aufwies; bei kritisch kranken Patienten mit einem Verlust der Muskelmasse und somit erniedrigtem SCr könnte eine Erholung überbewertet werden [61, 63, 64].

Ein fortgeschrittenes Alter sowie eine vorbestehende CKD sind mit einem schlechteren *Outcome* und einer geringeren Wahrscheinlichkeit der Erholung nach AKI assoziiert [16, 65]. Die ausgeschiedenen Urinmenge ist ein wichtiger Marker für die Unabhängigkeit von einer Nierenersatztherapie und eine kumulativ hohe Flüssigkeitsakkumulation trotz RRT korreliert mit einer geringeren Erholung nach AKI [66]. Da AKI mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität assoziiert ist, werden bei der Langzeitbeobachtung nach AKI-Episoden als Endpunkte die Dialysepflichtigkeit, die Mortalität und eine längerfristig bestehende Verschlechterung der Nierenfunktion, zusammengefasst als *major adverse kidney event* (MAKE), immer häufiger gebündelt nachbeobachtet [67, 68].

Um frühzeitig Therapieentscheidungen treffen zu können, beispielsweise bezüglich des Zeitpunktes des Beginns oder der Beendigung eines Nierenersatzverfahrens, ist es wichtig, eine potenzielle Erholung der Patienten nach AKI vorhersagen zu können [69]. Aufgrund multipler Probleme bei der Verwendung des SCr bei der Einschätzung der Erholung nach AKI wird zunehmend untersucht, ob neuere Biomarker als Prognosemarker nach AKI dienen können. Srisawat et al. demonstrierten, dass bei Patienten mit nosokomialer Pneumonie und AKI erhöhte NGAL-Plasmalevel mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit einer Erholung nach AKI assoziiert waren [70]. NGAL und KIM-1 wurden zudem also potenzielle Biomarker für eine Prädiktion einer Erholung nach AKI untersucht: eine Hochregulation der o.g. Biomarker war mit einer schnelleren Progression einer chronischen Nierenerkrankung assoziiert [26]. In der RUBY-Studie untersuchten Hoste et al. [71] den Urin und das Plasma von Patienten mit höhergradiger AKI auf der Intensivstation auf prädiktive Biomarker für einen persistierenden Nierenschaden. In der Studie konnte der *C-motif chemokine ligand 14* (CCL14) aus dem Urin als bester untersuchter Biomarker mit einer AUC von 0,83 eine persistierende AKI Grad 3 vorhersagen. Zudem korrelierte der Expressionsgrad von CCL14 mit dem AKI-Schweregrad [71]. Die Expression von miRNAs und ihre Bedeutung als Biomarker bei der Entstehung von Krankheiten rücken immer weiter in den Forschungsfokus. Bisher wurden schon einige Daten zu miRNAs und ihrer Rolle bei der Entstehung von nephrologischen Krankheitsbildern erfasst [72-74]. Das Potenzial von miRNAs als prädiktive Marker für eine Erholung nach AKI wurde bisher jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

1.2 Nichtkodierende RNAs

Seit festgestellt wurde, dass nur ca. 2 % der menschlichen Gene Proteine kodieren und der Großteil des menschlichen Genoms in nicht-kodierende RNA-Moleküle umgeschrieben werden [75], rücken diese nicht-kodierenden RNAs immer weiter in den Forschungsfokus. Nicht-kodierende RNAs (*noncoding RNA*,

ncRNA) gehören zu einer großen Gruppe von RNA-Molekülen, die von DNA (Desoxyribonukleinsäure) transkribiert, aber nicht in Proteine umgeschrieben werden [76]. Sie beeinflussen unter anderem posttranskriptionell die Genexpression und sind in eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Apoptose, Zelldifferenzierung und Proliferation involviert [77]. Anhand ihrer Größe und Funktion werden ncRNAs in Untergruppen eingeteilt: Das sind kleine ncRNA (*small ncRNA*) mit einer Länge von < 200 Nukleotiden, sowie lange ncRNAs (*long ncRNA*) mit einer Länge von > 200 Nukleotiden [77] (Abb. 1). Die langen ncRNAs werden in lineare ncRNAs (lncRNAs) und in zirkuläre ncRNAs (circRNA) unterteilt. Die am besten erforschten kleinen ncRNAs sind die miRNAs.

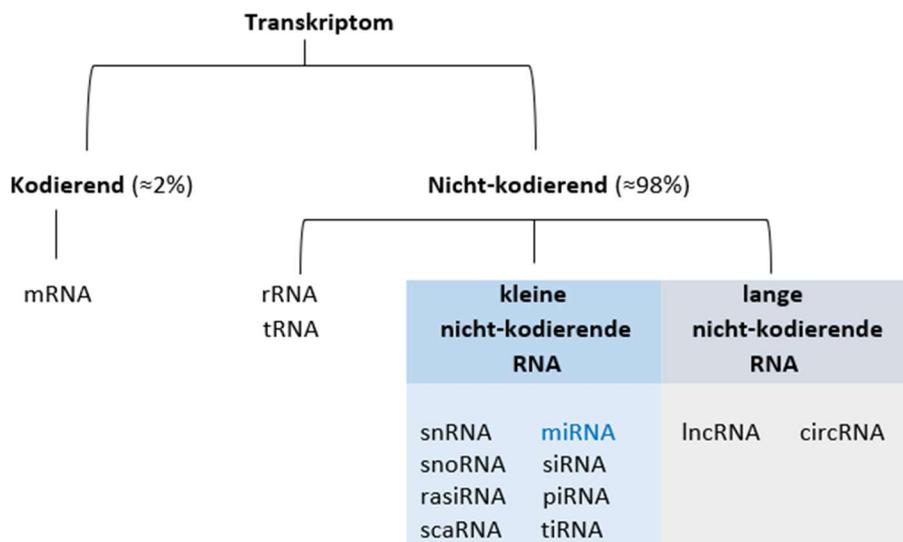


Abb. 1: Unterteilung der nichtkodierenden RNAs

Unterteilung des Transkriptoms und der nicht-kodierenden RNAs modifiziert nach [28].
circRNA = circular RNA; *lncRNA* = long non-coding RNA; *mRNA* = messenger RNA; *miRNA* = microRNA; *piRNA* = piwi-interacting RNA; RNA = Ribonukleinsäure; *rRNA* = ribosomal RNA; *rasiRNA* = repeat-associated small interfering RNA; *scaRNA* = small cajal body-specific RNA; *sniRNA* = small interfering RNA; *snRNA* = small nuclear RNA; *snoRNA* = small nucleolar RNA; *tRNA* = transfer RNA; *tiRNA* = transfer RNA-derived stress-induced RNA

1.2.1 Definition und Synthese von miRNAs

Unter den *small-ncRNAs* sind die miRNAs hervorzuheben, die aus 18-22 Nukleotiden bestehen und insbesondere posttranskriptionell die Genexpression regulieren [78]. Sie erkennen kleine Sequenzen ihrer Ziel-messengerRNA

(mRNA), sodass eine miRNA viele mRNAs beeinflussen kann und eine mRNA der Kontrolle vieler verschiedener miRNAs unterliegen kann [79, 80]. Einige miRNAs zeigen eine gewebstypische Expression [81], andere entstehen ubiquitär [82], sodass komplexe Netzwerke entstehen. MiRNAs werden durch die RNA-Polymerase II als längere primäre miRNAs (pri-miRNAs) im Nukleus transkribiert und falten sich zu haarnadelförmigen Schleifen zusammen [80, 83, 84]. Die Sequenzen für die miRNA-Transkription liegen entweder in Introns von Protein-kodierenden Genen oder unabhängig von Genen im Genom verteilt [85]. Die pre-miRNA wird über RAN-GTP und Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert [86]. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch die Dicer RNase III zu einer reifen miRNA-Duplex aus 23 Nukleotiden prozessiert [87, 88] (Abb.2). Nach Integration in den *miRNA induced silencing complex* (RISC) werden die doppelsträngigen miRNAs entwunden, einer der RNA-Stränge wird abgebaut und der andere fungiert als reifer miRNA-Strang [89] (Abb.2).

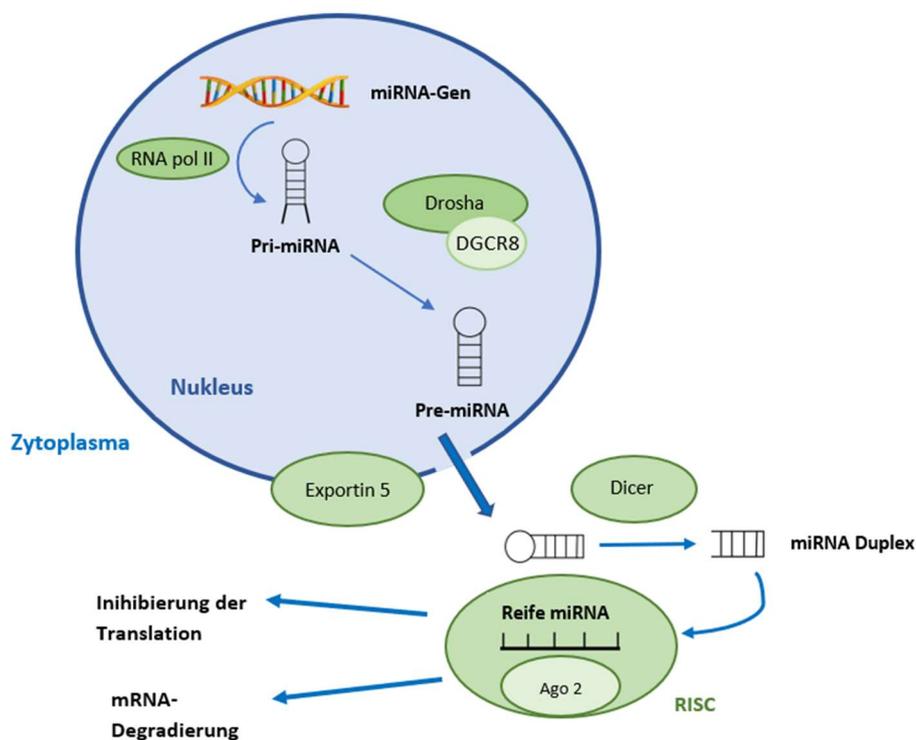


Abb. 2: Biosynthese, Reifung und Funktion von miRNAs

Darstellung der Biosynthese, Reifung und Funktion von miRNAs modifiziert nach [80]

Ago2 = Argonaut 2; DGCR8 = *DiGeorge syndrome critical region 8*; miRNA = mikroRNA; Pre-miRNA = *precursor-miRNA*; pri-miRNA = primäre miRNA; RNA = Ribonukleinsäure; RNA pol II = RNA-Polymerase II

1.2.2 Bindung von miRNAs an ihre Zielstruktur

Diese reife miRNA wird zur ihrer Ziel-mRNA gebracht und bindet an die 3' untranslatierte Region (UTR) ihrer komplementären mRNA [90]. Die Nukleotide in Position 2 bis 8 im 5'-Bereich der miRNA werden als *Seed*-Sequenz bezeichnet und sind essenziell für die Bindung der miRNA an die jeweilige Ziel-mRNA [80]. Die Ziel-mRNA wird bei nahezu idealer Komplementarität entweder durch Protein Argonaut 2 (Ago2) gespalten und abgebaut, bei unzureichender komplementärer Basenpaarung wird die Translation gehemmt [91, 92].

1.2.3 MiRNAs bei pathologischen Prozessen

Seitdem die erste miRNA Lin-4 1993 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde [93], konzentrierten sich viele Forschungsprojekte auf die Suche nach weiteren miRNAs in Pflanzen und Säugetieren. Die in 2002 gegründete miRBase-Datenbank enthält als Online-Archiv für miRNAs (Version 22) mittlerweile ca. 48.000 bekannte miRNA-Sequenzen, davon kommen ca. 2000 im Menschen vor [94]. MiRNAs kontrollieren mehr als 50 % der Gene von Säugetieren, beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse und sind durch eine Dysregulation mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert [85]. Die Vielzahl an Funktionen der miRNAs deutet auf ihre Relevanz bei der Krankheitsentstehung hin, sodass sich in den letzten Jahren viele Forschungsprojekte auf die Assoziation von miRNAs mit verschiedenen Krankheitsbildern fokussiert haben. Bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, maligner Tumoren und Nephropathien ist die Rolle von miRNAs bereits gut dokumentiert [95-97].

1.2.4 MiRNAs bei akuter Nierenschädigung

Einige Studien zeigen, dass eine Vielzahl an miRNAs in Nierengewebe exprimiert werden, darunter miR-146a, miR-886, miR-192, miR-194, miR204, miR-215 and miR-216, miR-21, miR-130 und miR-196a/b [80]. Aguido-Fraile und Kollegen konnten Expressionsunterschiede zwischen einigen miRNAs im Serum von Patienten mit AKI im Vergleich zu nierengesunden Patienten zeigen [73]. Diese miRNAs, darunter miR-101-3p, miR127-3p, miR-210-3p, miR-126-3p, miR-26b-5p, miR-29a-3p, miR-146a-5p, miR-27a-3p, miR93-3p und miR-10a-5p konnten

eine AKI-Entwicklung noch vor kardiochirurgischen Eingriffen vorhersagen und waren auch während der AKI früher erhöht als herkömmliche Marker wie das SCR [73]. Diese o.g. miRNAs könnten demnach als potenzielle Biomarker für AKI bei Patienten auf der Intensivstation und nach kardiochirurgischen Eingriffen dienen. Die diagnostische Performance war mit einer AUC zwischen 0,9 und 1 für alle untersuchten miRNAs sehr hoch. Die Serum-Levels einiger miRNAs korrelierten zudem mit dem AKI-Schweregrad [73]. In einer Studie von Gaede et al. mit 115 Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen konnten Patienten mit erhöhtem AKI-Risiko anhand der miR-21-Expression bereits vor der operativen Versorgung identifiziert werden (AUC 0.71) [98]. In den o.g. Studien sind die miRNAs bei AKI meist vermehrt exprimiert und korrelieren mit dem Schweregrad der AKI, jedoch sind andere miRNAs bei AKI vermindert exprimiert oder haben einen protektiven Effekt. In einer Studie von Bhatt et al. wurde festgestellt, dass miR-34 bei Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität einen zytoprotektiven Effekt hatte und eine Antagonisierung der miR-34 zu höheren Apoptoseraten führte [99]. Lorenzen und Kollegen zeigten, dass miR-16 und miR-320 im Plasma von kritisch kranken Patienten mit AKI herunterreguliert waren; miR-210 dagegen war bei Patienten mit akuter Nierenschädigung vermehrt exprimiert und wurde als neuer, unabhängiger Prognosemarker für die 28-Tages-Überlebenswahrscheinlichkeit diskutiert [100]. Beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom sowie bei Larynxkarzinomen wird miR-210 zudem als Pro-Angiomir diskutiert, da sie in Proben von Patienten mit Karzinomen vermehrt exprimiert war und eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese spielen könnte [101, 102]

1.2.5 MiRNAs als diagnostische und therapeutische Marker

Ein Grund für das Potenzial von miRNAs als Biomarker beruht auf ihrer Stabilität in Geweben und Körperflüssigkeiten, z.B. in Serum und Urin [103]. Sie sind resistent gegenüber längerer Lagerung bei Raumtemperatur, pH-Variabilität und mehreren Zyklen des Einfrierens und Auftauens [103-106]. MiRNAs können verlässlich mittels quantitativer *RealTime*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert und quantifiziert werden und bieten aufgrund ihrer Analyse anhand von Sequenzen eine hohe Spezifität [107]. Die große Rolle der miRNAs bei der Entstehung von Krankheiten wirft die Frage auf, ob anhand von miRNAs

therapeutische Strategien entwickelt werden können. Die vielseitigen Funktionen der miRNAs bieten die Möglichkeit verschiedener therapeutischer Angriffspunkte, zum Beispiel durch ein Herunterregulieren von miRNAs durch Antagonisieren oder durch eine Imitation mittels miRNA-mimetischer RNA-Fragmente, sogenannter *Mimics* [74]. In einigen Tiermodellen wurden diese therapeutischen Optionen bereits getestet [108-110]. Eine Inhibierung von miR-192 in Mäusen mit diabetischer Nephropathie konnte eine renale Fibrosierung verringern [108]. Im Rahmen der Krankheitsentstehung sind miRNAs häufig vermehrt exprimiert. Diese Annahme führte dazu, dass miRNA-Antagonisten, sogenannte antisense Oligonukleotide (Antagomirs), als neue Medikamentengruppe entwickelt werden [109]. In Mausmodellen sind miR-17 und miR-21 bei polyzystischer Nierenerkrankung hochreguliert und sind mit einer Krankheitsprogression assoziiert; ein spezifischer anti-miR17-Inhibitor durchläuft bereits präklinische Studien, um die Sicherheit und therapeutischen Effekte dieses neuen Inhibitors zu untersuchen [110]. Janssen et al. [111] testeten in einer 2a-Studie von 2013 bei Patienten mit Hepatitis C ein Antisense-Oligonukleotid (Miravirsen) zur Antagonisierung der miR-122, die in der Leber exprimiert wird. Durch Miravirsen wurde die Funktion der miR-122 inhibiert und dosisabhängig die Hepatitis C-Viruslast verringert [111]. Bis zur risikoarmen Anwendung beim Menschen müssen jedoch die vielen miRNAs und ihre Involvierung in verschiedenste pathophysiologische Prozesse noch weiter erforscht werden. Da viele miRNAs nicht gewebsspezifisch sind, könnte eine Hoch- oder Herunterregulation ihrer Expression auch unerwünschte Organsysteme beeinflussen. Eine Kombination von miRNAs mit zell- oder gewebsspezifischen Antikörpern oder Peptiden könnte ein gezielteres Eingreifen in einzelne Pathologien ermöglichen [112].

1.3 Ziele der Arbeit

Die intensivmedizinische Therapie der AKI ist von zentraler Bedeutung. AKI ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert und resultiert in hohen Versorgungskosten

bei langen Krankenhausaufenthalten. Die therapeutischen Optionen sind limitiert und bisher gibt es kaum Möglichkeiten zur Früherkennung. Trotz vieler Studien zum Thema AKI weisen die geläufigen Biomarker große Lücken bei der Prävention, der Früherkennung und der Erholung der Nierenfunktion auf. Durch eine häufige Progression der AKI in eine CKD ist eine Langzeitbeobachtung der Patienten sowie eine genauere Kenntnis über das Erholungspotenzial nach AKI von zentraler Bedeutung. Die Möglichkeit, durch neue prädiktive Biomarker eine Erholung der Nierenfunktion nach AKI vorhersagen zu können, könnte Therapieentscheidungen (beispielsweise zur Initiierung einer RRT) beeinflussen und diese Biomarker könnten möglicherweise als neue therapeutische Angriffspunkte dienen.

MiRNAs gelten als vielversprechende Marker, die durch eine vielseitige Involvierung in Signalkaskaden viele biologische Prozesse beeinflussen können. Sie sind als stabile Moleküle in Urin- und Plasmaproben nachzuweisen und werden als potenzielle Biomarker bei verschiedenen Pathologien sowie als mögliche therapeutische Angriffspunkte diskutiert.

Ziel bzw. primärer Endpunkt dieser nicht-interventionellen Beobachtungsstudie ist der Nachweis des prädiktiven Wertes von miRNAs als Marker für die Erholung der Nierenfunktion.

Die Studienpatienten werden über einen Zeitraum von 365 Tagen nachbeobachtet, um eine langfristige Erholung nach AKI sowie eine Progression zu einer CKD feststellen zu können. Als sekundäre Endpunkte werden an Tag 30, 90 und 365 das SCr, die Erholung der Nierenfunktion, die Abhängigkeit von der Dialyse, die Sterblichkeit sowie Komplikationen (Schlaganfall, kardiovaskuläre Events, Myokardinfarkt) nachverfolgt. Die Kombination aus Mortalität, Dialyse und renaler Dysfunktion werden an Tag 30, 90 und 365 als MAKE zusammengefasst beobachtet, um langfristige Folgen einer AKI zu evaluieren.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Nach Erteilung eines positiven Ethikvotums durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studien-ID 6138R) wurden Patienten mit AKI-Stadien 2 und 3 der interdisziplinären operativen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf zwischen Januar 2018 und Dezember 2018 eingeschlossen. Die Diagnosestellung der AKI erfolgte anhand der KDIGO-Kriterien [4] durch den betreuenden Intensivmediziner. Einschlusskriterien waren das Vorliegen eines AKI-Stadiums 2 oder 3 nach KDIGO sowie ein Alter der Patienten zwischen 18 und 90 Jahren. Folgende Ausschlusskriterien wurden definiert: eine AKI mit der Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens innerhalb der letzten 90 Tage, eine CKD mit einer GFR < 30 ml/min, eine chronische dialysepflichtige Nierenerkrankung, eine Nierentransplantation innerhalb der letzten 12 Monate, eine AKI aufgrund einer Ligation einer Nierenarterie und aufgrund von Glomerulonephritis, Vaskulitis oder postrenaler Obstruktion, eine Schwangerschaft sowie eine Beziehung zum Studienteam (Mitarbeiter, Verwandte). Eine weitere Voraussetzung für den Studieneinschluss war das Vorliegen einer unterschriebenen Einverständniserklärung des einwilligungsfähigen Patienten, des Betreuers oder Vorsorgebevollmächtigten. Bei Aufklärung und Einwilligung durch einen Betreuer oder Vorsorgebevollmächtigten im Falle eines eingeschränkten Bewusstseins der Patienten, wurden diese nach Wiedererlangen des Bewusstseins aufgeklärt und willigten dann ebenfalls schriftlich in die Studienteilnahme ein. Nach schriftlicher Einwilligung wurden an jeweils 4 verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach AKI-Diagnosestellung) Blut- und Urinproben aus liegenden arteriellen Kathetern und Urinkathetern gewonnen (Abb. 3).

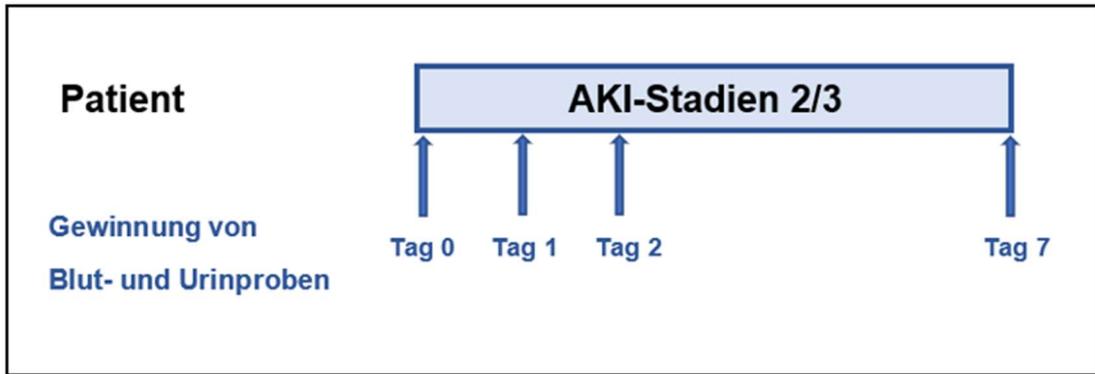


Abb. 3: Studienablauf

Schematische Darstellung der Gewinnung von Blut- und Urinproben der Patienten mit AKI Stadien 2 und 3 zu vier verschiedenen Zeitpunkten (an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI-Diagnosestellung). AKI = *acute kidney injury*

Die Entnahme der Blut- und Urinproben erfolgte über vorhandene arterielle oder zentralvenöse Katheter und Blasenkateter in EDTA- und Urinröhrchen (Tabelle 3). Im Anschluss wurden die Proben mit 3500rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Tabelle 4), aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80°C gelagert. Bei fehlendem arteriellen und zentralvenösen Kathetern sowie Blasenkatetern erfolgte keine Probengewinnung.

2.2 Material

2.2.1 Materialien für die Probengewinnung und Asservierung

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Firma
EDTA-Röhrchen	BD Vacutainer ® EDTA-Röhrchen, 3ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Urinröhrchen	BD Vacutainer ® Röhrchen, 11ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Reagiergefäß	Reagiergefäß 2,0ml SafeSeal	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht (Deutschland)
10 ml Spritze	Injekt ® Luer Solo 10ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

Tabelle 3: Material für die Probengewinnung und Asservierung der Plasma- und Urinproben

ml = Milliliter

2.2.2 Geräte

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
BGA-Gerät	ABL800 FLEX BGA-Gerät	Radiometer GmbH, Krefeld (Deutschland)
Laborzentrifuge	ROTINA 420 R	Hettich, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen (Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete Geräte für die Blutgasanalysen (BGA) und die Asservierung der Plasma- und Urinproben

2.2.3 Software

Software	Hersteller
Microsoft Word 365 Version 2205	Microsoft Corporation ®
Microsoft Excel 365 Version 2202	Microsoft Corporation ®
GraphPad Prism ® Version 5.03	GraphPad Software Inc
Endnote X9	Clarivate Analytics (ehem. Thomson Reuters)

Tabelle 5: Verwendete Software

2.3 Erfassung klinischer Daten in *Case Report Files*

Es wurden relevante klinische Patientendaten in pseudonymisierter Form als *Case Report Form* (CRF) in einer Excel-Tabelle an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI erfasst. Die Daten wurden aus dem Krankenhausinformationssystem CGM Medico, den handschriftlichen Dokumentationsbögen der interdisziplinären Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie aus Arztbriefen vom Hausarzt oder vorherigen Krankenhausaufenthalten gewonnen.

2.3.1 Patientencharakteristika

Das Geschlecht, die Größe, das Gewicht und der *Body Mass Index* (BMI) aller Patienten wurden erfasst. Der BMI wird definiert als das Körpergewicht in kg dividiert durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat. Die Vormedikation sowie einige Vorerkrankungen, wie ein Diabetes mellitus, eine vorherige AKI-Episode, CKD, eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), eine

Herzinsuffizienz und ein arterieller Hypertonus wurden erfragt. Bei jedem Patienten wurde erfasst, ob vor dem Aufenthalt auf der Intensivstation eine operative Versorgung erfolgte. Das AKI-Stadium wurde anhand der KDIGO-Definition [4] vom behandelnden Intensivmediziner definiert und das *Baseline*-SCr wurde dokumentiert. Als *Baseline*-SCr wurden Werte verwendet, die zwischen 6 Monaten und einem Tag vor AKI-Diagnosestellung bestimmt wurden. Diese Werten stammten entweder vom behandelnden Hausarzt oder wurden im Krankenhausaufenthalt vor der AKI-Episode bestimmt.

2.3.2 Säure-Base-Haushalt und Elektrolyte

Die Blutgasanalysen (BGAs) der Patienten (Elektrolyte, Hämoglobin, *BaseExcess*, pH-Wert, Laktat, arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2), arterielle Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$), inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2)) wurden routinemäßig auf der Intensivstation gemessen. Die Werte an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI wurden von den intensivmedizinischen Dokumentationskurven übernommen.

2.3.3 Laborparameter und klinische Daten

Es wurden Parameter einer Infektion bzw. Sepsis (C-reaktives Protein (CRP), Leukozyten, Procalcitonin (PCT), Interleukin-6 (IL-6), Temperatur), Parameter der Nierenfunktion (*Baseline*-SCr, SCr, GFR, CysC, CystatinC-GFR, Urinausscheidung, Flüssigkeitsbilanz) sowie Parameter der Kreislauffunktion (Herzfrequenz (HF), mittlerer arterieller Druck (MAD), Katecholamintherapie) aufgezeichnet. Es wurde erfasst, ob die Zuordnung des AKI-Stadiums anhand einer Oligurie oder anhand des SCr erfolgte und ob bei den Patienten absolute Indikationen für eine RRT vorlagen. Als absolute Indikationen für eine RRT wurde eine Hypervolämie, eine Hyperkaliämie, eine metabolische Azidose und urämische Komplikationen zusammengefasst. Gerinnungsparameter, inklusive Quick, partielle Thromboplastinzeit (pTT) sowie Thrombozyten wurden erfasst. Alle Parameter wurden, wenn vorhanden, an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI beobachtet. Die Laborwerte stammten aus den routinemäßigen täglichen Kontrollen auf der Intensivstation und wurden im Zentrallabor des

Universitätsklinikums Düsseldorf analysiert. Bei fehlenden Laborwerten erfolgte keine nachträgliche Bestimmung bzw. keine erneute Blutentnahme. Bei jedem Patienten wurde dokumentiert, ob während des Krankenhausaufenthaltes eine mechanische Kreislaufunterstützung benötigt wurde (*Extracorporeal Life Support System*, ECLS).

2.3.4 Klinische Scores

Es wurden Scores für das Bewusstsein (*Glasgow Coma Scale*, GCS), zum Erfassen von Organdysfunktionen während einer Sepsis (*Sequential Organ Failure Assessment*, SOFA) sowie zum Abschätzen der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten auf der Intensivstation (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*, APACHE II-Score) erhoben. Beim GCS wird das Bewusstsein des Patienten anhand von 3 Kategorien eingestuft: 1) Öffnen der Augen 2) beste motorische Reaktion und 3) beste verbale Reaktion. [113]. Der Patient erhält mindestens 3 und maximal 15 Punkte; je weniger Punkte desto ausgeprägter die Bewusstseinsbeschränkung. Der SOFA-Score vergibt für sechs Organsysteme (Atemtätigkeit, Zentrales Nervensystem, Herz-Kreislauf-System, Leberfunktion, Blutgerinnung und Nierenfunktion) Punkte; je ausgeprägter die Organdysfunktion, desto höher ist die erreichte Punktzahl [114]. Im APACHE II-Score werden Punkte für das Patientenalter und akute sowie chronische Organeinschränkungen vergeben; je höher die erreichte Punktzahl, desto größer ist die Mortalitätswahrscheinlichkeit [115]. Der SOFA-Score und der GCS wurden an den Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI-Diagnosestellung erfasst, der APACHE-II-Score nur einmalig am Tag der AKI-Diagnosestellung.

2.3.5 Stationärer Verlauf

Bei jedem Patienten wurde die Mortalität, die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation, die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus sowie die Dialysepflichtigkeit während des Krankenhausaufenthaltes erfasst. Das SCr wurde bei Entlassung von der Intensivstation sowie vor Entlassung aus dem Krankenhaus im CRF festgehalten. Die Beatmungsdauer sowie die Dauer und der Nierenersatztherapie wurden dokumentiert. Das Auftreten unerwünschter

Ereignisse wie ein Schlaganfall oder Herzinfarkt während der Behandlung auf der Intensivstation und im Krankenhaus wurden erhoben.

2.3.6 Nachbeobachtung

Die Nachbeobachtung der Patienten erfolgte an Tag 30, 90 und 365 nach AKI-Diagnosestellung in telefonischen Interviews. Die aktuellen SCr-Werte, eine Dialysepflichtigkeit, ein Versterben und unerwünschte Ereignisse (Herzinfarkt und Schlaganfall) wurden nachbeobachtet und entweder beim Patienten oder bei dem behandelnden Hausarzt erfragt. Die SCr-Werte stammten entweder aus einer Nachkontrolle aus dem jeweiligen Labor des behandelnden Hausarztes oder, falls zu dem jeweiligen Beobachtungszeitpunkt vorhanden, aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf im Rahmen einer erneuten stationären Aufnahme oder ambulanten Nachkontrolle. Als MAKE 30, 90 und 365 wurden zusätzlich die Mortalität, eine Dialysepflichtigkeit sowie eine weiterhin bestehende Nierenschädigung ($\text{SCr} > 1,5\text{-fache des } \textit{Baseline}\text{-SCr}$) an Tag 30, 90 und 365 zusammengefasst. Beim Zutreffen eines der Kriterien galt MAKE als positiv.

2.3.7 Definition einer frühen Erholung nach AKI

Die Patienten wurden anhand der Entwicklung des SCr in zwei Gruppen aufgeteilt; in eine Gruppe mit früher Erholung und in eine Gruppe ohne frühe Erholung der Nierenfunktion nach AKI. Als frühe Erholung definierten wir den Rückgang des SCr auf weniger als das 1,5-fache des *Baseline*-SCr innerhalb von 7 Tagen nach AKI-Diagnosestellung. Patienten mit einem kontinuierlichen Nierenersatzverfahren an Tag 7 oder Patienten, die vor oder an Tag 7 verstarben, wurden als nicht erholt klassifiziert.

2.4 Statistische Methoden zur Auswertung der CRFs

Die deskriptive Statistik sowie die statistische Auswertung der Daten aus den CRFs erfolgten mittels Microsoft Excel 365 Version 2202 und GraphPad Prism® Version 5.03 nach Beratung durch PD Dr. rer. nat. Pablo E. Verde (Koordinierungszentrums für klinische Studien des Universitätsklinikums Düsseldorf). Die deskriptive Statistik der Studienpopulation wurde anhand von absoluten und relativen Werten, Mittelwert und Standardabweichung (*standard deviation*, SD) beschrieben. Bei nicht-parametrischen Daten wurde zusätzlich der Median angegeben. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests. Die Unterschiede der parametrische Daten zwischen zwei unverbundenen Gruppen wurden mittels ungepaarten T-Test, die nicht parametrischen Daten mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Assoziation zwischen kategorischen Variablen in den beiden Gruppen (Erholung vs. Nicht-Erholung) wurde mit dem Chi-Square-Test, bei kleinen Datensätzen mit dem Fisher Test, getestet. Für alle Tests galten p-Werte < 0,05 als signifikant. Es wurde eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt, um den Zusammenhang zwischen der Erholung der Nierenfunktion innerhalb von 7 Tagen nach AKI und der 1-Jahres-Mortalität darzustellen. Die Graphen wurde mit GraphPad Prism Version 5.03 und Microsoft Excel 365 Version 2202 erstellt.

2.5 Experimentelle Versuche

2.5.1 *Next Generation Sequencing*

Ein Screening auf miRNAs und auf Expressionsunterschiede in den Plasmaproben der Patienten erfolgte mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) durch ein externes Labor (QIAGEN Genomic Services in Hilden, Deutschland). NGS ist ein Hochumsatzverfahren, bei dem innerhalb kürzester Zeit viele DNA-Moleküle parallel sequenziert werden können [116, 117]. Für das NGS wurden die Patienten anhand des Rückgangs des Serum-SCr innerhalb von 14 Tagen in zwei Gruppen eingeteilt. Patienten mit einem Rückgang des SCr auf weniger als

das 1,5-fache das *Baseline*-SCr und ohne RRT galten als erholt; Patienten ohne entsprechenden Rückgang des SCr und Patienten unter RRT galten als nicht erholt. Aus den zwei Gruppen wurden jeweils 6 Patienten mit einer vergleichbaren Ursachenverteilung für eine AKI ausgewählt. In beiden Gruppen wurden nur Patienten ausgewählt, die eine AKI durch einen kardiochirurgischen Eingriff, eine Sepsis oder einen großen Blutverlust sowie Kontrastmittelexposition erlitten. Die Ursachenverteilung war in beiden Gruppen ähnlich, um einen möglichen Bias bezüglich des Expressionsmusters der miRNAs abhängig von der Genese zu minimieren. Die Plasmaproben dieser 12 Patienten an Tag 1 nach AKI-Diagnose wurden QIAGEN Genomic Services in Hilden zur Verfügung gestellt, um die Proben mittels NGS auf miRNAs und auf Expressionsunterschiede der miRNAs zwischen den beiden Gruppen zu untersuchen. QIAGEN Genom Services in Hilden (Deutschland) führte dazu folgende zwei Schritte durch: 1) die RNA-Vorbereitung bzw. Isolation und 2) die Herstellung einer RNA-Bibliothek sowie die Sequenzierung.

1) RNA-Isolation

Die RNA aus den Plasmaproben wurde mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN Genomic Services, Hilden Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

2) Erstellung einer RNA-Bibliothek und NGS

In den nächsten Schritten wurde ebenfalls durch QIAGEN Genomic Services in Hilden eine RNA-Bibliothek erstellt, die RNA wurde amplifiziert und schließlich sequenziert. Die Vorbereitung der miRNA-Bibliothek erfolgte mittels QIAseq® miRNA Library Prep kit (QIAGEN Genomic Services, Hilden, Deutschland). Die RNA wurde fragmentiert und universelle Sequenzier-Adapter wurden an das 3' und 5' Ende der miRNAs ligiert. *Unique Molecular Indices* (UMIs) wurden an die RNA ligiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit UMIs, um Fehler während der RNA-Amplifikation zu vermeiden, um die miRNAs einfacher identifizieren zu können und um doppelte *Reads* zu eliminieren. Die cDNA wurde mittels PCR (22 Zyklen) amplifiziert, währenddessen wurden *Barcodes* (Indizes) hinzugefügt und anschließend wurden die Proben gereinigt. Die Vorbereitung der qualitätskontrollierten Bibliothek QC erfolgte mittels Bioanalyzer 2100 (Agilent®),

Santa Clara, CA, USA) und TapeStation 4200 (Agilent®, Santa Clara, CA, USA). Die RNA-Sequenzierung erfolgte mittels NextSeq500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben, wobei 12 Millionen Sequenzen pro Probe generiert wurden. Die Anzahl der Sequenzierungs-Zyklen betrug 75 Nukleotid-*Single-end-Reads* (46 Basenpaar-Insertionen + 19bp Basenpaar-3' Linker + 10 UMIs). Als Referenzgenom für das *Mapping* der *Reads* wurde folgendes Genom verwendet: Organismus: Homo_sapiens; Referenzgenom: GRCh37, *Annotation reference*: mirbase_20. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden in FASTQ-Dateien umgewandelt mittels bcl2fastq-Software (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) und mit dem FastQC-tool (Babraham Bioinformatics) qualitätskontrolliert. Das NGS, durchgeführt von QIAGEN Genomic Services, bildete die Basis für die nachfolgende Untersuchung der Plasmaproben aller Patienten mittels qRT-PCR.

Die statistische Analyse des NGS erfolgte ebenfalls durch QIAGEN Genomic Services in Hilden. Der Expressionsgrad von Genen wird in NGS-Experimenten als *Transcripts Per Million* (TPM) berechnet; die Anzahl der *Reads* für eine bestimmte miRNA wird durch die Anzahl der gesamten *Reads* des Mappings dividiert und mit einer Million multipliziert [118]. Die Normalisierung der Ergebnisse des NGS erfolgte mittels TMM-Normalisierung (*Trimmed Mean of M-values Normalization Method*) [119]. Die TMM-Normalisierung zur Analyse der Expressionsunterschiede zwischen den Proben erfolgte mittels EdgeR (Bioconductor, <http://bioconductor.org/>). Durch das NGS ist zwar die Anzahl der jeweiligen *Reads* pro Probe bekannt, jedoch nicht die gesamte Menge an RNA pro Probe, die stark variieren kann. In einer Probe mit einem großen RNA-Gehalt könnten bestimmte Gene im NGS demnach unterrepräsentiert werden, im Vergleich zu einer Probe mit wenig RNA-Gehalt [119]. Die TMM-Methode schafft eine bessere Vergleichbarkeit des RNA-Gehalts von zwei Proben in dem die *Fold Change* (FC) des RNA-Gehalts zwischen zwei Proben bestimmt wird, nachdem die Gene mit der höchsten und niedrigsten Expression ausgeschlossen werden [119, 120]. Die FC ist ein Maß für die Quantifizierung der differentiellen Expression eines Gens zwischen zwei Proben [121]. Wenn sich das Expressionsverhältnis zwischen zwei Proben nicht unterscheidet, beträgt die FC 1; wenn ein Gen in einer Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe

hochreguliert wird, ist die $FC > 1$ [121]. Die FC-Werte der differentiell exprimierten miRNAs wurden zur vereinfachten Darstellung einer Hoch- bzw. Herunterregulation logarithmiert ($\log FC$). Um die *false discovery rate* (FDR) bei gleichzeitiger Anwendung mehrerer statistischen Tests zu reduzieren, wurden die p-Werte mittels Benjamini-Hochberg-Korrektur adjustiert. Die mittels Benjamini-Hochberg adjustierten p-Werte waren identisch mit der FDR.

2.5.2 Netzwerkanalysen

Aus den gefundenen miRNAs wurden extern durch unsere Kooperationspartner am Luxembourg Institute of Health (Yvan Devaux und Lu Zhang) Interaktionsnetzwerke erstellt und biologische Prozesse identifiziert, die durch miRNAs und ihre Dysregulation beeinflusst werden. Dazu wurde zuerst die *National Center for Biotechnology*-(NCBI)Gen-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf Gene untersucht, die mit einer akuten Nierenschädigung assoziiert sind. Für die Suche in der Datenbank wurden folgende, aus dem Englischen übersetzte Schlüsselwörter verwendet: renale Insuffizienz, Niereninsuffizienz, renale Schädigung, Nierenschädigung, renales Versagen oder Nierenversagen. Anschließend wurde in miRNA-Datenbanken TargetScan 7.2 (<https://www.targetscan.org/>), miRWalk 3 (<https://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) und miRSearch V3.0 (<http://www.exiqon.com/microna-target-prediction>) nach möglichen Bindungsstellen dieser Gene gesucht, auf die die gefundenen miRNAs abzielen. Mittels der STRING-Datenbank (<https://string-db.org/>) wurden Protein-Protein-Interaktionen zwischen den identifizierten nierenassoziierten Genen vorhergesagt [122]. Die STRING-Datenbank gibt einen Überblick über Zusammenhänge bzw. direkte und indirekte Interaktionen zwischen Proteinen. Wenn Proteine beispielsweise in gleichen Stoffwechselwegen vorkommen oder sich gegenseitig regulieren, werden diese Interaktionen in der Datenbank erfasst [122]. In Netzwerkanalysen wurden dann die jeweiligen miRNAs mit ihren nierenassoziierten Zielgenen sowie den Geninteraktionen zusammengefasst. Die Analyse der Anreicherung (*Fold Enrichment*) der miRNAs sowie ihre Protein-Protein-Interaktionen und ihre Assoziation zu relevanten zellulären Prozessen erfolgte mittels DAVID-Datenbank (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*,

<https://david.ncifcrf.gov/>). Als *Fold Enrichment* wird die Überrepräsentation bzw. vermehrte Anreicherung von differentiell exprimierten Genen im Vergleich zu einer Referenzgruppe bezeichnet [123]. Für die Suche wurden folgende Filter verwendet: eine FDR < 0,05 und mindestens ein Erreichen des 4. Level der GO-Hierarchie (GO, Gene Ontology; <http://www.geneontology.org>). GO ist ein Projekt, das Informationen über molekulare Funktionen, biologische Prozesse und die Lokalisation von Genen in hierarchischer Anordnung bereitstellt [124]; diese Informationen werden von Computern analysiert und ermöglichen eine Verknüpfung dieser Informationen mit experimentellen Ergebnissen. Je höher das Level der GO-Hierarchie, desto spezifischer der Prozess. Anschließend wurden mittels REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) überschüssige Ergebnisse entfernt. REVIGO ist ein Webserver, der zur Zusammenfassung und Entfernung redundanter Ergebnisse einer GO-Analyse dient [125]. Bei der *Enrichment*-Analyse wird also untersucht, ob die molekularen Funktionen und biologischen Prozessen einer bestimmten Gengruppe im Vergleich zu einer Referenzgruppe überrepräsentiert sind. Die o.g. Schritte erfolgten ausschließlich durch unsere Kooperationspartner des Luxembourg Institute of Health.

2.5.3 Quantitative *Real-Time* PCR

Die Plasmaproben aller Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI wurden für die qRT-PCR ausgewählt. Vorher erfolgte die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen; in eine Gruppe mit früher Erholung nach AKI und in eine Gruppe ohne Erholung der Nierenfunktion anhand der bereits beschriebenen Definition der Erholung der Nierenfunktion (siehe Abschnitt 2.3.7). Mittels qRT-PCR sollten Expressionsunterschiede der miRNAs zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden und die Ergebnisse des NGS verifiziert werden. Mit der qRT-PCR können Nukleinsäuren (RNA oder DNA) detektiert und mittels fluoreszierender Farbstoffe photometrisch quantifiziert werden [126]. Vor einer qRT-PCR-Analyse muss die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgewandelt werden. Die qRT-PCR-Analyse erfolgte vollständig durch TAmiRNA in Wien, Österreich. Dazu wurde zuerst die gesamte RNA der Proben, inklusive smallRNAs, von 200µl Plasma mittels Promega miRNA Plasma/Serum kit nach Herstellerangaben (Promega, Fitchburg, WI, USA) extrahiert. Die gesamte RNA wurde in 50µl nuklease-freiem

Wasser herausgelöst. Die Reverse Transkription (RT) wurde in 10µl-Reaktionen mit 2µl RNA-Input mittels miRCURY RT kit (QIAGEN Genomic Services, Hilden, Deutschland) durchgeführt. RT, bestehend aus Polyadenylierung und reverser Transkription, wurde bei 42°C für 60 Minuten, gefolgt von Hitzeinaktivierung bei 95°C für 5 Minuten, durchgeführt. Die gewonnene cDNA wurde 1:20 für die qPCR-Amplifikation in 10µl Reaktionen verdünnt, unter Verwendung des miRCURY SYBR® Green Mastermix (QIAGEN Genomic Services, Hilden, Deutschland). MiRCURY LNA-enhanced dual-specific microRNA primer Assays (QIAGEN Genomic Services, Hilden, Deutschland) wurden verwendet. Die Reaktionen wurden in 384-well-Platten durch einen epMotion Liquid Handling Robot (Eppendorf, Österreich) vorbereitet. Pro Probe wurden die ausgewählten miRNAs und drei Kontroll-Prüfungen analysiert. Die Kontrollprüfungen waren synthetische *Spike-In*-Kontrollen, die bei der RNA-Extraktion (UniSp4), der cDNA-Synthese (cel-miR-39) und PCR-Amplifikation (UniSp3) hinzugefügt wurden. Diese Kontrollen ermöglichten eine Normalisierung und Überprüfung der technischen Varianz der Probenentnahme und der Probenqualität, der RNA-Extraktion, der RT sowie der PCR-Amplifikation. Die qRT-PCR wurde im LightCycler 480 II (Roche, Deutschland) durchgeführt, beginnend mit einer zweiminütigen Aktivierung bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden. Die Erfassung der Schmelzkurven zur Unterscheidung zwischen miRNAs und Primer-Dimeren erfolgte nach 95°C für 10 Sekunden mittels kontinuierlicher Akquisition zwischen 55°C and 99°C mit einer Rampe von 0.11°C/Sekunde und 5 Akquisitionen pro °C.

Cycle quantification-Werte (Cq-Werte) wurden mit der *Second Derivative Maximum* - Methode mit der Roche Software bestimmt. Bei der qPCR gibt der Cq-Wert die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen an, bis das Fluoreszenzsignal einen vorgegeben Schwellenwert überschreitet [127]. Der Cq-Wert ist somit ein Maß für die Quantität der miRNAs in den untersuchten Patientenproben; je größer die Menge der miRNA, desto schneller ist der Schwellenwert bei der Amplifikation erreicht und desto geringer ist der Cq-Wert. Die Normierung bzw. Eichung der miRNA-Cq-Werte erfolgte, indem die *Uni-Spike-In 4* als interner Standard verwendet wurde. *Uni-Spike-In 4* ist eine synthetische miRNA, die im menschlichen Genom nicht vorkommt. Delta Cq-

Werte (ΔCq) wurden berechnet, indem die miRNA-Cq-Werte von den *Uni-Spike-In 4-Cq*-Werten (UniSp4) anhand folgender Formel subtrahiert wurden:

$$\text{Delta Cq-Wert } (\Delta Cq) = Cq_{(\text{UniSp4})} - Cq_{(\text{miRNA})}$$

Die statistische Analyse der qRT-PCR erfolgte ausschließlich extern durch einen Bioinformatiker von TAmiRNA in Wien, Österreich. Die Daten wurden als Median mit interquartilen Rängen präsentiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels ungepaarten Wilcoxon-Tests (da keine Normalverteilung vorlag) mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testverfahren. Adjustierte p-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Um die prädiktive Stärke der miRNAs als Biomarker zu charakterisieren, wurden *receiver operating characteristics (ROC)*-Analysen berechnet und die AUC mit Hilfe der trapezoiden Regel mit nicht-parametrischen 95 %-Konfidenzintervallen berechnet. Bei einer ROC-Analyse wird die Sensitivität auf der Y-Achse gegen 1-Spezifität auf der X-Achse aufgetragen; die einzelnen Messwerte des zu untersuchenden Tests werden im Graphen aufgetragen und ergeben die ROC-Kurve [128]. Eine diagonale Linie zwischen X-Achse und der Y-Achse bedeutet, dass der Test keine diagnostische Güte besitzt. Bei einer AUC = 0,5 hat der Biomarker keinen prognostischen Nutzen zur Prädiktion einer Erholung der Nierenfunktion nach AKI.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 72 Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf mit den AKI-Stadien 2 oder 3 in die Studie eingeschlossen. Bei einem Patienten wurde das Einverständnis zur Studie nachträglich zurückgezogen, sodass dieser Patient aus der Studie ausgeschlossen wurde. Somit wurden die Daten von insgesamt 71 Patienten ausgewertet. Die Patienten wurden anhand des Rückgangs des SCr auf weniger als das 1,5-fache des *Baseline*-SCr innerhalb von 7 Tagen in zwei Gruppen eingeteilt: in eine Gruppe der Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI und in eine Gruppe ohne frühe Erholung der Nierenfunktion nach AKI. Als erholt wurden nur die Patienten gewertet, die ohne ein kontinuierliches Nierenersatzverfahren an Tag 7 einen Rückgang des SCr auf weniger als das 1,5-fache des *Baseline*-SCr zeigten. Die Patienten, die innerhalb der ersten 7 Tage verstarben, galten ebenfalls als nicht erholt. Von den 71 eingeschlossenen Patienten erholten sich 18 Patienten früh, die anderen 53 Patienten erholten sich nicht innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI-Diagnosestellung (Abb. 4).

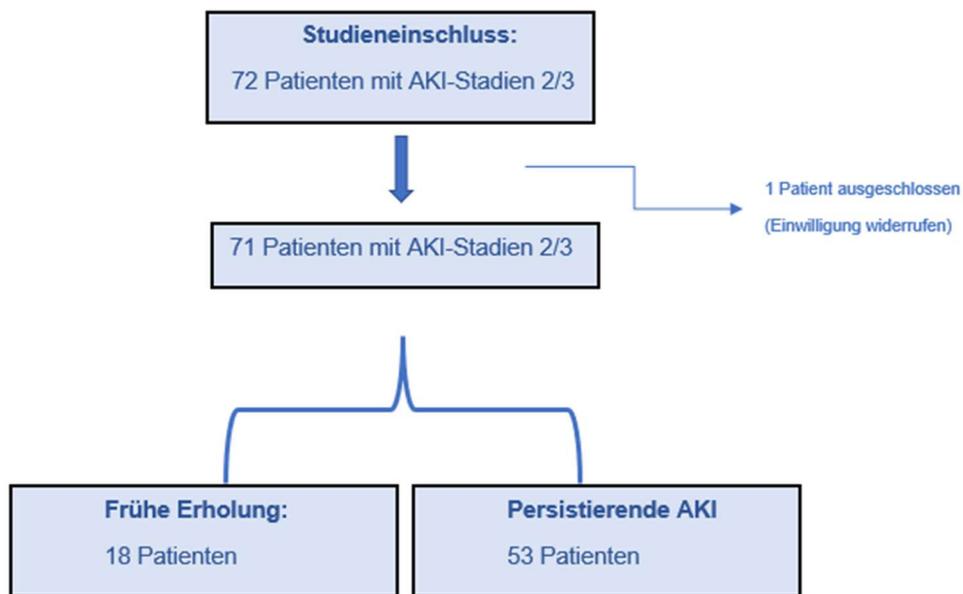


Abb. 4: Studienverlauf und Einteilung in Gruppen

Schematische Darstellung der eingeschlossenen Patienten sowie die Einteilung in zwei verschiedenen Gruppen anhand der Erholung der Nierenfunktion innerhalb der ersten 7 Tage nach der AKI-Diagnosestellung. 72 Patienten wurden eingeschlossen, davon hat ein Patient seine Einwilligung nachträglich widerrufen. Die 71 Patienten wurden anhand des Rückgangs des Serum-Kreatinins innerhalb von 7 Tagen in zwei Gruppen eingeteilt, in eine Gruppe mit einer frühen Erholung und in eine Gruppe ohne Erholung nach AKI. AKI = *acute kidney injury*

Sowohl das *Baseline*-SCr sowie das SCr der Patienten an den ersten sieben Tagen nach AKI-Diagnosestellung wurden bestimmt. In Abb. 5 ist repräsentativ für die Gruppe der Patienten mit früher Erholung nach AKI der Verlauf des SCr während des Krankenhausaufenthalts eines Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI ohne RRT dargestellt. Abb. 6 zeigt den Verlauf des SCr eines Patienten ohne Erholung mit persistierender eingeschränkter Nierenfunktion während des Krankenhausaufenthaltes.

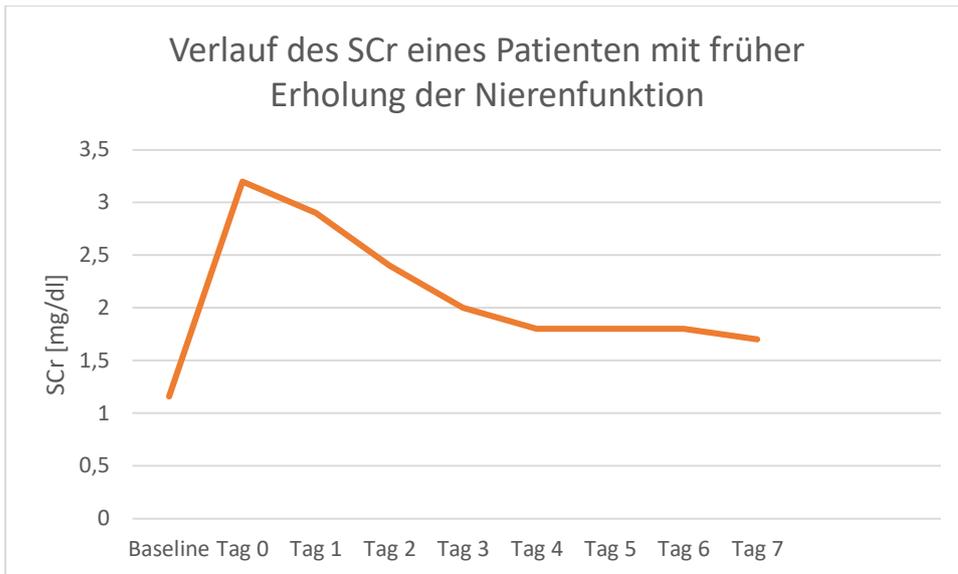


Abb. 5: Verlauf des Serum-Kreatinins bei einem Patienten mit früher Erholung der Nierenfunktion

Darstellung des Serum-Kreatinins (SCr) in mg/dl während des Krankenhausaufenthaltes eines Patienten mit einer frühen Erholung der Nierenfunktion nach AKI (*acute kidney injury*)
 dl = Deziliter; mg = Milligramm; SCr = Serum-Kreatinin

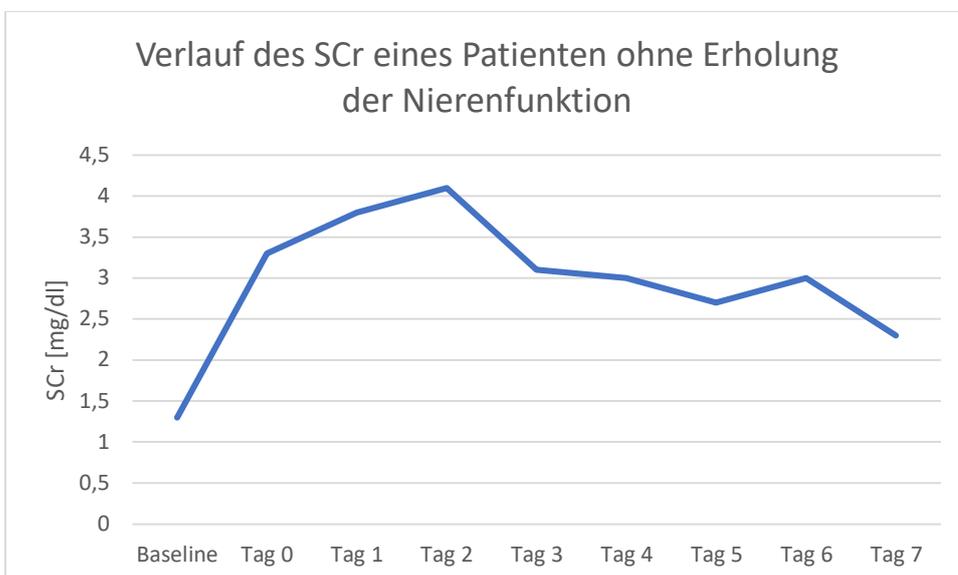


Abbildung 6: Verlauf des Serum-Kreatinins bei einem Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion

Verlauf des Serum-Kreatinins (SCr) in mg/dl während des Krankenhausaufenthaltes eines Patienten mit ausbleibender Erholung der Nierenfunktion
 dl = Deziliter; mg = Milligramm; SCr = Serum-Kreatinin

3.2 Demographische und klinische Daten

3.2.1 Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv setzte sich zu 27 % aus Frauen (19 Frauen) und zu 73% aus Männern (52 Männer) zusammen (Tabelle 6). Die Gruppe der Patienten mit einer frühen Erholung bestand aus 4 Frauen und 14 Männern, die Gruppe ohne Erholung aus 15 Frauen und 38 Männern. Insgesamt 73 % (38 Patienten) der Männer erholten sich nicht nach AKI, bei den Frauen erholten sich 78 % (15 Patientinnen) nicht. Die Patienten waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses zwischen 28 und 90 Jahre alt. Das mediane Alter betrug 73 Jahre bei den Patienten mit früher Erholung und bei den Patienten ohne Erholung betrug das mediane Alter 68 Jahre. Der BMI lag zwischen 16,98 kg/m² und 45,11 kg/m². Der mittlere BMI betrug in der Gruppe ohne Erholung 27,8 kg/m² und in der Gruppe mit früher Erholung 26,2 kg/m². Mit einem BMI von mehr als 30 kg/m² waren 28 % der Patienten übergewichtig (Tabelle 6). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf das Alter, die Größe, das Gewicht und den BMI.

Patientencharakteristika	Gesamt (n=71)	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	p-Wert
Alter [Jahre], Mittelwert (Median) ± SD	68 (69) ± 12,2	67 (68) ± 13,0	71 (73) ± 9,04	0,318
Frauen, Anzahl (%)	19 (27)	15 (29)	4 (22)	0,762
Größe [cm], Mittelwert ± SD	1,75 ± 0,96	1,74 ± 0,098	1,77 ± 0,086	0,219
Gewicht [kg], Mittelwert (Median) ± SD	84 (80) ± 22,6	85 (80) ± 23,8	82 (80) ± 18,9	0,963
BMI [kg/m ²], Mittelwert ± SD	27,2 ± 5,48	27,8 ± 5,74	26,2 ± 5,37	0,296

Tabelle 6: Patientencharakteristika

Darstellung der Patientencharakteristika als absolute Anzahl und in Prozent (%), als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) und als Median für nicht-parametrischen Daten. Die Patienten wurden unterteilt in die gesamte Studienpopulation, in die Gruppe ohne und in die Gruppe mit einer frühen Erholung der Nierenfunktion. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. BMI = *Body Mass Index*; cm = Zentimeter; kg = Kilogramm; m² = Quadratmeter; n = Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

Die Patienten der Studie waren multimorbide und wurden mit multiplen Medikamenten vorbehandelt. Bei der Erfassung der Vormedikationen bestand nur ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der Einnahme von Betablockern (p = 0,015) (Tabelle 7). In der Gruppe der

Patienten ohne Erholung nach AKI nahmen 66 % der Patienten Betablocker ein, in der Gruppe mit Erholung waren bei 33 % der Patienten Betablocker in der Vormedikation enthalten. Insgesamt wurden 54 (76 %) der Patienten operativ versorgt (40 Patienten ohne Erholung und 14 Patienten mit einer Erholung), bei den anderen 17 Patienten (24 %) erfolgte keine operative Versorgung (Tabelle 7). Insgesamt waren 21 % aller Patienten bereits vor Studieneinschluss an einer CKD erkrankt (15 von 51 Patienten, davon 4 der Patienten mit früher Erholung und 11 der Patienten ohne Erholung). Insgesamt 32 % der Patienten waren herzinsuffizient (24 von 71 Patienten, davon 4 Patienten mit Erholung und 10 Patienten mit ausbleibender Erholung) und 63 % litten an einem arteriellen Hypertonus (45 von 71 Patienten, davon 11 der erholten Patienten und 34 der Patienten ohne Erholung). In der Gruppe ohne Erholung nach AKI waren 36 % der Patienten Diabetiker, 15 % litten an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Von den erholten Patienten waren 33 % der Patienten Diabetiker und 17 % litten an einer COPD (Tabelle 8). In der Gruppe der Patienten mit ausbleibender Erholung litten 30 % der Patienten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses oder in der Vergangenheit an einer malignen Tumorerkrankung; bei den Patienten mit früher Erholung litten 44 % der Patienten an einer Tumorerkrankung. Keine der Vorerkrankungen unterschied sich signifikant zwischen den beiden beobachteten Patientengruppen (Tabelle 8).

Patientencharakteristika	Gesamt (n=71)	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	p-Wert
Vormedikation, Anzahl (%)				
Betablocker	41 (58)	35 (66)	6 (33)	0,015
Diuretika	32 (45)	22 (42)	10 (56)	0,301
NSAR	8 (11)	4 (8)	4 (22)	0,189
Kortikosteroide	9 (13)	8 (15)	1 (6)	0,432
Operative Versorgung, Anzahl (%)	54 (76)	40 (76)	14 (78)	1

Tabelle 7: Vormedikation und Anzahl der Patienten mit einer operativen Versorgung

Vormedikation der Patienten sowie die Anzahl der Patienten mit einer operativen Versorgung dargestellt als Anzahl und in Prozent (%). Es wurden die Werte der gesamten Studienpopulation, der Patienten mit früher Erholung der Nierenfunktion und der Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion nach AKI verglichen. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant
n = Anzahl der Patienten; NSAR = nicht steroidale Antirheumatika

Patientencharakteristika	Gesamt (n=71)	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	p-Wert
Vorerkrankungen, Anzahl (%)				
- Übergewicht, BMI > 30 kg/m ²	20 (28)	15 (28)	5 (28)	0,966
- CKD	15 (21)	11 (21)	4 (22)	1
- Z.n. AKI	5 (7)	3 (6)	2 (11)	0,595
- Herzinsuffizienz	23 (32)	19 (36)	4 (22)	0,387
- arterieller Hypertonus	45 (63)	34 (64)	11 (61)	0,817
- Diabetes mellitus	25 (35)	19 (36)	6 (33)	0,847
- COPD	11 (16)	8 (15)	3 (17)	1
- Maligne Tumorerkrankung	24 (34)	16 (30)	8 (44)	0,269

Tabelle 8: Vorerkrankungen und Vormedikationen

Vorerkrankungen der Studienpopulation dargestellt als Anzahl und in Prozent (%). Es wurden die Werte der gesamten Studienpopulation, der Patienten mit früher Erholung der Nierenfunktion und der Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion nach AKI verglichen. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. BMI = *body mass index*; CKD = *chronic kidney disease*; COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung; n = Anzahl der Patienten; Z.n. AKI = Zustand nach *acute kidney injury*

Aufgrund einer Multimorbidität der eingeschlossenen Patienten mit vielen potenziellen Einflüssen auf die Nierenfunktion wurden die wahrscheinlichsten Ursachen für eine AKI erfasst. Eine am ehesten kardiochirurgisch assoziierte AKI (*cardiac surgery associated acute kidney injury, CSA-AKI*) entwickelten 27 Patienten (38 %); 20 Patienten aus der Gruppe der Patienten, die sich nicht erholten und 7 Patienten aus der Gruppe mit Erholung. Einen großen nicht-kardiochirurgischen Eingriff (darunter abdominelle Eingriffe und eine Thrombektomie bei einem Gefäßverschluss der Hand) erhielten 16 Patienten (23 %). Insgesamt 15 Patienten (21 %) erlitten eine AKI im Rahmen einer Sepsis und nur 2 Patienten (3 %) entwickelten eine AKI am ehesten durch Kontrastmittelexposition in Kombination mit einer operativen Versorgung. Insgesamt entwickelten 5 von 71 Patienten (7 %) eine AKI aufgrund eines kardiogenen Schocks ohne operative Versorgung (Abb. 7). Weitere Ursachen für eine AKI, beispielsweise im Rahmen einer Pneumonie, einer Blutung oder einer Reanimation, wurden in Abb. 7 als sonstige Ursachen zusammengefasst. Unabhängig von der AKI-Ursache benötigten 9 Patienten im Verlauf ihres Krankenhausaufenthaltes ein *Extracorporeal Life Support System (ECLS)*.

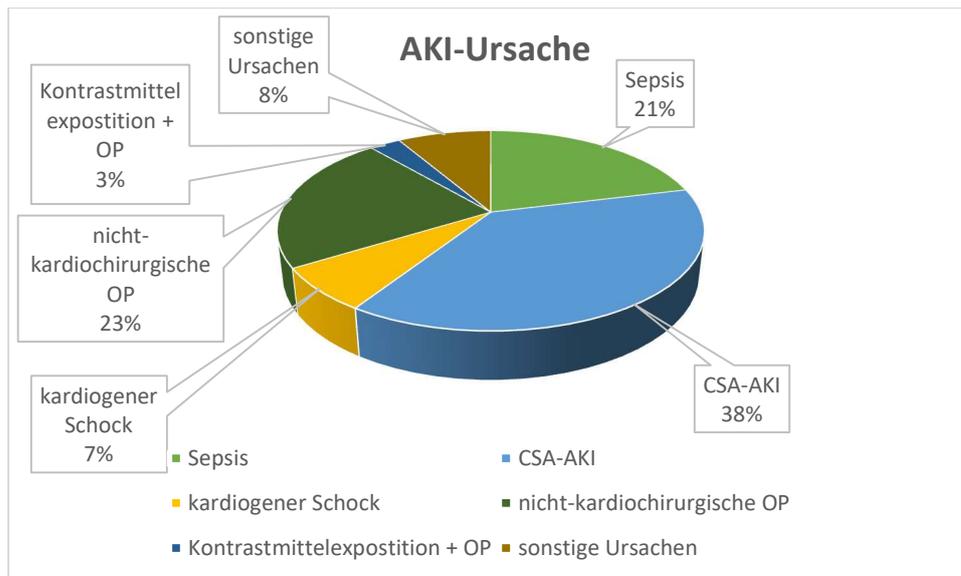


Abb. 7: Wahrscheinliche Ursache für eine AKI in der Studienpopulation

Verteilung der wahrscheinlichen Ursache für eine AKI in der Studienpopulation dargestellt in Prozent (%). AKI = *acute kidney injury*, CSA-AKI = *cardiac surgery associated acute kidney injury*, OP = Operation

3.2.2 Blutgasanalysen, Elektrolyte und Säure-Base-Haushalt

Da nicht alle Patienten zu den 4 gemessenen Zeitpunkten über einen arteriellen oder zentralvenösen Katheter verfügten, manche Patienten bereits verlegt wurden oder verstorben sind, konnten nicht von allen Patienten BGAs entnommen werden. In den BGAs waren die Kaliumwerte an allen 4 Tagen in der Gruppe ohne Erholung nach AKI statistisch signifikant erhöht (Tabelle 9). Das mediane Kalium lag am ersten Tag bei 5,0 mmol/l in der Gruppe der erhaltenen Patienten, bei den nicht-erhaltenen Patienten lag das mediane Kalium am ersten Tag bei 4,85 mmol/l. Auch am 7. Tag nach AKI war das Kalium in der Gruppe ohne Erholung statistisch signifikant höher als in der Gruppe mit früher Erholung nach AKI ($p < 0,001$) mit einem medianen Kalium-Wert von 4,9 mmol/l bei Patienten ohne Erholung vs. 4,1 mmol/l bei den früh erhaltenen Patienten. Weder die Natrium-Werte noch der *BaseExcess* beider Gruppen unterschieden sich zu den beobachteten Zeitpunkten signifikant (Tabelle 9). Die Patienten mit ausbleibender Erholung hatten an den ersten drei Tagen nach AKI ein statistisch signifikant erhöhtes Laktat ($p = 0,001$; $p = 0,04$ und $p = 0,02$). Am 7. Tag nach AKI bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den gemessenen Laktatwerten zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 9).

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert
	Mittelwert \pm SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert \pm SD	Median	Anzahl der Daten	
BaseExcess [mmol/l]							
Tag 0	-0,98 \pm 4,58	-0,80	52	-0,43 \pm 3,77	-0,25	16	0,649
Tag 1	-0,32 \pm 3,20	-0,55	50	0,74 \pm 4,08	0,4	15	0,460
Tag 2	0,32 \pm 3,72	0	49	1,61 \pm 4,18	1,05	14	0,212
Tag 7	-1,08 \pm 3,24	-1,40	38	0,04 \pm 4,37	-1,20	8	0,685
Kalium [mmol/l]							
Tag 0	5,09 \pm 0,48	5,00	53	4,78 \pm 0,41	4,85	18	0,041
Tag 1	5,09 \pm 0,35	5,10	50	4,64 \pm 0,45	4,60	17	< 0,001
Tag 2	5,03 \pm 0,37	5,00	49	4,79 \pm 0,39	4,90	15	0,044
Tag 7	4,91 \pm 0,46	4,90	43	4,28 \pm 0,62	4,10	17	< 0,001
Natrium [mmol/l]							
Tag 0	141 \pm 6,45	140	53	140 \pm 5,50	140	18	0,705
Tag 1	142 \pm 6,34	140	50	139 \pm 5,72	139	17	0,263
Tag 2	142 \pm 7,36	141	49	141 \pm 5,84	140	15	0,494
Tag 7	142 \pm 8,99	139	43	139 \pm 6,78	139	16	0,326
Laktat [mmol/l]							
Tag 0	4,07 \pm 4,12	2,65	52	1,82 \pm 1,36	1,50	17	0,001
Tag 1	2,82 \pm 2,62	1,95	50	1,50 \pm 0,77	1,40	16	0,004
Tag 2	2,81 \pm 2,60	2,10	49	1,39 \pm 0,64	1,35	14	0,002
Tag 7	2,07 \pm 1,24	1,75	40	1,63 \pm 0,99	1,30	11	0,155

Tabelle 9: Blutgasanalysen und Elektrolyte der Patienten im Verlauf

Blutgasanalysen dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) und als Median für nicht-parametrische Daten an 4 Messzeitpunkten (Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach AKI-Diagnosestellung (*acute kidney injury*, AKI)). Verglichen wurden die Werte der Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung nach AKI. P-Werte $<$ 0,05 galten als statistisch signifikant. Die Anzahl der erfassten Daten wurde dokumentiert. AKI = *acute kidney injury*; mmol/l = Millimol pro Liter; n = Anzahl der Patienten; SD = *standard deviation* (Standardabweichung)

An Tag 0 ($p = 0,047$), an Tag 2 ($p = 0,003$) und an Tag 7 ($p = 0,003$) nach AKI benötigten die Patienten der Gruppe ohne Erholung eine statistisch signifikant höhere inspiratorische Sauerstoffzufuhr als Patienten mit früher Erholung nach AKI. Die Sauerstoffsättigung der Patienten in der Gruppe mit Erholung nach AKI unterschied sich an keinem Tag signifikant von der Sauerstoffsättigung der Patienten ohne Erholung (Tabelle 10). Auch im paO_2 und $paCO_2$ gab es an keinem Tag einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
pH-Wert							
Tag 0	7,35 ± 0,09	7,36	52	7,37 ± 0,05	7,37	16	0,582
Tag 1	7,37 ± 0,06	7,39	50	7,40 ± 0,04	7,41	15	0,157
Tag 2	7,38 ± 0,06	7,39	49	7,41 ± 0,05	7,42	14	0,132
Tag 7	7,38 ± 0,09	7,40	38	7,44 ± 0,08	7,45	8	0,042
paO₂ [mmHg]							
Tag 0	77,0 ± 16,0	74,1	52	70,7 ± 10,5	69,7	16	0,253
Tag 1	73,5 ± 12,8	74,6	50	72,5 ± 10,3	73,8	15	0,950
Tag 2	73,8 ± 11,9	73,1	49	69,0 ± 8,2	67,9	14	0,162
Tag 7	73,7 ± 11,2	73,2	38	68,4 ± 8,86	66,1	8	0,135
paCO₂ [mmHg]							
Tag 0	35,9 ± 5,16		52	35,6 ± 6,27		16	0,836
Tag 1	36,3 ± 5,67		50	36,2 ± 7,09		15	0,936
Tag 2	35,8 ± 4,21		49	35,9 ± 7,68		14	0,937
Tag 7	33,8 ± 5,78		38	31,4 ± 7,98		8	0,310
SaO₂ [%]							
Tag 0	93,8 ± 4,03	94,9	52	93,5 ± 3,86	94,1	16	0,534
Tag 1	93,7 ± 3,60	94,6	50	94,3 ± 2,83	94,6	15	0,858
Tag 2	93,3 ± 4,05	94,2	49	92,7 ± 3,61	93,9	14	0,333
Tag 7	93,5 ± 5,74	94,5	38	93,8 ± 1,38	94,0	8	0,460
FiO₂ [%]							
Tag 0	0,58 ± 0,23	0,50	52	0,47 ± 0,19	0,44	18	0,047
Tag 1	0,52 ± 0,23	0,44	50	0,43 ± 0,24	0,36	18	0,099
Tag 2	0,50 ± 0,21	0,45	49	0,35 ± 0,22	0,21	18	0,003
Tag 7	0,45 ± 0,20	0,40	43	0,29 ± 0,13	0,21	17	0,003

Tabelle 10: Blutgasanalysen und Sauerstoffzufuhr der Patienten im Verlauf

Blutgasanalysen dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) und als Median für nicht-parametrische Daten an 4 Messzeitpunkten (Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 7 nach AKI-Diagnosestellung) (*acute kidney injury*, AKI). Verglichen wurden die Werte der Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Die Anzahl der erfassten Daten wurde dokumentiert. AKI = *acute kidney injury*; FiO₂ = inspiratorische Sauerstofffraktion; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule; mmol/l = Millimol pro Liter; n= Anzahl der Patienten; paO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck; paCO₂ = arterieller Kohlendioxidpartialdruck; SaO₂ = Sauerstoffsättigung; SD = *standard deviation* (Standardabweichung)

3.2.3 Laborparameter

a) AKI-Diagnosestellung

Die AKI-Diagnosestellung erfolgte durch den behandelnden Intensivmediziner der interdisziplinären operativen Intensivstation anhand der KDIGO-Kriterien. Bei insgesamt 9 % aller Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion war die Urinausscheidung so gering, dass aufgrund einer Oligurie ein AKI-Stadium 2 oder 3 erreicht wurde (Tabelle 11). Ein Anstieg des SCr mit Erreichen eines AKI-

Stadiums 2 oder 3 traf bei insgesamt 51 % aller Patienten ohne Erholung zu; bei 9 Patienten mit persistierendem Nierenschaden wurde die AKI-Diagnose sowohl anhand des SCr als auch anhand der Urinausscheidung gestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied bei der AKI-Diagnosestellung zwischen den beiden Gruppen bestand für keines der vorliegenden Kriterien. Bei 23 % der Patienten mit ausbleibender Erholung lag am Tag der AKI-Diagnosestellung eine absolute Dialyseindikation vor ($p = 0,029$) (Tabelle 11).

	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	p-Wert
Diagnosestellung aufgrund von, Anzahl (%)			
- Oligurie	5 (9)	3 (17)	0,409
- Serum-Kreatin	27(51)	13 (72)	0,116
- Oligurie und Serum-Kreatinin	9 (17)	2 (11)	0,718
- Absolute RRT-Indikation,	12 (23)	0 (0)	0,029

Tabelle 11: AKI-Diagnosestellung

Darstellung der Diagnosestellung der AKI aufgrund von vier Kriterien als Anzahl und in Prozent (%). Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. n = Anzahl der Patienten; RRT = *renal replacement therapy*

b) Parameter der Nierenfunktion

Bei 42 Patienten lag bei Diagnosestellung ein AKI-Stadium 2 vor; bei 29 Patienten ein AKI-Stadium 3. Unter einem AKI-Stadium 2 litten 60 % der Patienten ohne Erholung und 61 % der Patienten mit Erholung der Nierenfunktion. Ein AKI-Stadium 3 wurde bei 40% der Patienten mit persistierender AKI bzw. bei 39 % der erholten Patienten diagnostiziert. Somit war der Schweregrad der AKI in beiden Patientengruppen ähnlich verteilt ohne signifikanten Unterschied. Nur am 7. Tag nach AKI-Diagnosestellung war das SCr bei den Patienten mit einer frühen Erholung der Nierenfunktion signifikant niedriger. Die Mittelwerte des *Baseline*-SCr lagen in beiden Gruppen bei 1,1 mg/dl, ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,9$) (Tabelle 12).

Parameter	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	p-Wert
AKI-Stadium 2, Anzahl (%)	32 (60)	11 (61)	0,956
AKI-Stadium 3, Anzahl (%)	21 (40)	7 (39)	0,956
AKI-Stadium, Mittelwert (Median) ± SD	2,4 (2,0) ± 0,49	2,39 (2,0) ± 0,5	0,963
Baseline-Kreatinin [mg/dl], Mittelwert ± SD	1,10 ± 0,29	1,10 ± 0,25	0,935

Tabelle 12: AKI-Stadien und Baseline-Kreatinin

Darstellung der AKI-Stadien der Patienten mit früher und ohne Erholung der Nierenfunktion nach AKI als Anzahl und in Prozent (%) sowie als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) und Median für nicht-parametrische Daten. Verglichen wurden die Werte der Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant.

AKI = *acute kidney injury*; dl= Deziliter; GFR = Glomeruläre Filtrationsrate; h = *hour*; kg = Kilogramm; l = Liter; M = Mittelwert; ml = Milliliter; n= Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

Zwischen den SCr-Werten und der GFR an Tag 0, 1 und 2 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Nur am 7. Tag nach AKI war das SCr in der Gruppe mit ausbleibender Erholung statistisch signifikant erhöht ($p = 0,024$) und die GFR statistisch signifikant erniedrigt ($p = 0,04$). Das mediane SCr betrug in der Gruppe mit Erholung am 7. Tag 1,22 mg/dl und in der Gruppe ohne Erholung 1,60 mg/dl (Tabelle 13). Der Harnstoff war ebenfalls am 7. Tag nach AKI bei den erholten Patienten signifikant niedriger als bei den Patienten ohne Erholung ($p = 0,002$). Das CysC sowie die CystatinC-GFR am 7. Tag wurde bei wenigen Patienten bestimmt, sodass keine statistische Analyse möglich war. An allen vier Messzeitpunkten war die Diurese in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI signifikant reduziert (Tabelle 13). Am Tag der AKI-Diagnosestellung lag die mediane Diurese bei den Patienten ohne Erholung bei 1,11 ml/kg/h; bei den erholten Patienten betrug die mediane Diurese 1,69 ml/kg/h. Am 7. Tag nach AKI lag die mediane Diurese von 0,88 ml/kg/h bei den erholten Patienten mit 1,63 ml/kg/h signifikant über der medianen Diurese bei den Patienten mit ausbleibender Erholung ($p = 0,002$). An allen beobachteten Zeitpunkten wurden die Patienten in beiden Gruppen im Mittel negativ bilanziert, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit persistierender Nierenschädigung und den Patienten mit einer schnellen Erholung der Nierenfunktion. Das SCr an Tag 0, 1 und 2 unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Patientengruppen (Tabelle 13).

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
Serum-Kreatinin [mg/dl]							
Tag 0	2,99 ± 1,23	2,70	53	2,77 ± 0,97	2,76	18	0,706
Tag	2,76 ± 1,06	2,62	50	2,40 ± 0,76	2,55	18	0,320
Tag 2	2,52 ± 1,14	2,39	50	2,08 ± 0,68	2,15	18	0,198
Tag 7	1,93 ± 1,04	1,60	43	1,26 ± 0,41	1,22	15	0,024
GFR [ml/min]							
Tag 0	22,9 ± 9,67	21,0	53	25,6 ± 17,4	20,5	18	0,931
Tag 1	26,2 ± 14,4	23,5	50	30,3 ± 22,2	22,0	18	0,626
Tag 2	32,1 ± 20,3	25,5	50	36,2 ± 24,6	28,5	18	0,377
Tag 7	43,2 ± 22,6	38,0	43	58,5 ± 25,5	55,0	15	0,040
Harnstoff [mg/dl]							
Tag 0	111 ± 55	98	53	104 ± 64	95	18	0,504
Tag 1	107 ± 46	105	50	103 ± 42	103	18	0,667
Tag 2	102 ± 53	104	50	98 ± 32	93	18	0,762
Tag 7	95 ± 41	86	43	63 ± 29	60	15	0,001
Cystatin C [mg/l]							
Tag 0	3,24 ± 1,13	2,93	30	2,76 ± 0,77	2,58	13	0,173
Tag 1	3,17 ± 0,83	3,06	21	2,72 ± 0,48	2,52	5	0,242
Tag 2	2,70 ± 0,33	2,67	4	2,48 ± 0,79	2,83	3	1,0
CystatinC-GFR [ml/min]							
Tag 0	20 ± 12	18	30	22 ± 8	22	13	0,198
Tag 1	18 ± 6	18	21	21 ± 4	22	5	0,267
Tag 2	21 ± 4	22	4	26 ± 15	19	3	1,0
Diurese [ml/kg/h]							
Tag 0	1,01 ± 0,85	1,12	51	1,87 ± 1,27	1,69	17	0,007
Tag 1	1,08 ± 0,99	0,85	50	2,07 ± 1,82	1,53	17	0,030
Tag 2	1,04 ± 1,02	0,89	49	2,40 ± 1,57	2,05	14	0,001
Tag 7	0,87 ± 0,74	0,88	42	1,94 ± 0,91	1,63	10	0,002
Flüssigkeitsbilanz [ml/24h]							
Tag 0	1268 ± 2829	777	51	-261 ± 1961	-59	17	0,087
Tag 1	-746 ± 1789	-855	50	-423 ± 2140	-310	17	0,508
Tag 2	-689 ± 1863	-728	48	-1241 ± 1865	-879	14	0,506
Tag 7	-353 ± 1079	-142	40	-167 ± 1199	-266	11	0,689

Tabelle 13: Parameter der Nierenfunktion im Verlauf

Darstellung relevanter Parameter der Nierenfunktion der Patienten mit früher und ohne Erholung der Nierenfunktion an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI-Diagnosestellung als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) und als Median für nicht-parametrische Daten. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. AKI = *acute kidney injury*; dl = Deziliter; GFR = Glomeruläre Filtrationsrate; h = *hour*; kg = Kilogramm; l = Liter; ml = Milliliter; n = Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

c) Parameter einer Infektion und Sepsis

Die Leukozyten waren in der Gruppe ohne Erholung nach AKI an 3 Messzeitpunkten (Tag 1, 2 und 7 nach AKI-Diagnosestellung) signifikant höher als in der Gruppe, die sich schnell erholt hat (Tabelle 14). An Tag 7 betrug die mediane Anzahl der Leukozyten bei den Patienten mit persistierendem Nierenschaden $16,3 \times 10^9/l$; bei den Patienten mit einer schnellen Erholung nach AKI betrug die mediane Anzahl der Leukozyten $10,1 \times 10^9/l$. Die gemessenen Temperaturen und das CRP in beiden Gruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant. Das mediane CRP lag in beiden Gruppen an allen gemessenen Zeitpunkten über dem Normalwert von $0,5 \text{ mg/dl}$. Auch das mediane PCT lag in beiden Gruppen zu jedem beobachteten Zeitpunkt über dem Normalwert von $0,5 \text{ ng/ml}$. Das mediane PCT an Tag 1 betrug $10,1 \text{ ng/ml}$ und am zweiten Tag $7,8 \text{ ng/ml}$ bei den Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion. Bei den Patienten in der Gruppe mit früher Erholung nach AKI betrug das mediane PCT an Tag 1 nach AKI $1,5 \text{ ng/ml}$ und an Tag 2 nach AKI $1,4 \text{ ng/ml}$. Das PCT war bei den Patienten mit ausbleibender Erholung zu beiden Zeitpunkten signifikant höher als in der Gruppe der Patienten mit Erholung (Tag 1: $p = 0,008$ und Tag 2: $p = 0,007$). Am 1. Tag und am 7. Tag nach AKI-Diagnosestellung wurden zu wenig IL-6-Werte bestimmt, sodass eine statistische Analyse nicht möglich war. Zu den anderen Zeitpunkten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den gemessenen IL-6-Werten zwischen den Patienten mit oder ohne Erholung (Tabelle 14). Insgesamt waren am Tag der AKI-Diagnosestellung der Mittelwert des PCT mit $19,6 \text{ ng/ml}$ und der Mittelwert des IL-6 mit 5363 ng/ml bei den Patienten mit persistierendem Nierenschaden und mit einem Mittelwert des PCT von $6,7 \text{ ng/ml}$ und des IL-6 von 271 ng/ml bei den erholten Patienten am höchsten.

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
Leukozyten [x10⁹/l]							
Tag 0	17,1 ± 10,2	14,8	53	15,0 ± 7,39	13,0	18	0,570
Tag 1	17,1 ± 8,9	15,4	51	12,8 ± 7,87	11,9	18	0,029
Tag 2	18,8 ± 12,3	15,0	50	11,8 ± 11,0	9,1	18	< 0,001
Tag 7	18,2 ± 8,9	16,3	43	12,0 ± 4,9	10,1	16	0,008
Temperatur [°C]							
Tag 0	37,7 ± 0,87	37,6	52	37,4 ± 0,64	37,3	17	0,322
Tag 1	37,5 ± 0,77	37,3	50	37,1 ± 0,61	37,1	16	0,197
Tag 2	37,6 ± 0,82	37,5	48	37,4 ± 0,79	37,3	15	0,467
Tag 7	37,5 ± 0,88	37,4	42	37,4 ± 0,62	37,4	17	0,962
CRP [mg/dl]							
Tag 0	19,3 ± 12,3	18,7	53	17,3 ± 11,8	13,5	18	0,526
Tag 1	21,3 ± 12,0	23,0	51	15,6 ± 11,4	12,0	18	0,089
Tag 2	19,5 ± 12,3	17,8	50	13,9 ± 10,9	10,8	17	0,110
Tag 7	10,9 ± 7,9	8,0	43	10,2 ± 9,5	5,3	15	0,303
PCT [ng/ml]							
Tag 0	19,6 ± 25,3	10,0	40	6,7 ± 8,3	3,1	11	0,080
Tag 1	18,8 ± 25,3	10,1	45	4,6 ± 5,7	1,5	11	0,008
Tag 2	16,4 ± 25,0	7,8	38	2,6 ± 3,2	1,4	8	0,007
Tag 7	7,3 ± 15,5	3,4	24	2,1 ± 2,8	2,1	2	0,471
IL-6 [ng/ml]							
Tag 0	5363 ± 12658	757	17	271 ± 233	205	5	0,137
Tag 2	405 ± 473	279	13	68 ± 37	73	3	0,139

Tabelle 14: Parameter einer Infektion und Sepsis

Darstellung der infektiologischen Parameter an Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI (*acute kidney injury*) als Mittelwert ± Standardabweichung und als Median für nicht-parametrischen Daten. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. C = Celsius; CRP = C-reaktives Protein; IL-6 = Interleukin 6; M = Mittelwert; mg = Milligramm; ml = Milliliter; n = Anzahl der Patienten; ng = Nanogramm; PCT = Procalcitonin; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

d) Parameter der Kreislauffunktion

Die Patienten der Gruppe ohne Erholung nach AKI benötigten an allen vier beobachteten Tagen mehr medikamentöse Kreislaufunterstützung als die Patienten mit Erholung nach AKI (Tabelle 15). Die infundierte Rate von Noradrenalin war an allen vier Tagen bei den nicht erholten Patienten statistisch signifikant höher als die Raten bei den erholten Patienten. Auch die notwendigen Epinephrin-Raten waren an Tag 0 (p = 0,023) und Tag 1 (p = 0,0496) nach AKI

bei den Patienten ohne Erholung statistisch signifikant höher als in der Gruppe der Patienten, die sich erholt haben. Am Tag der AKI-Diagnosestellung benötigten die Patienten beider Gruppen am meisten Kreislaufunterstützung. Über die nachfolgenden Tage stabilisierte sich der Kreislauf in beiden Gruppen mit weniger notwendiger Kreislaufunterstützung. Die mittlere Noradrenalin-Rate der Patienten ohne Erholung betrug am Tag der Diagnosestellung 0,306 µg/kg/min und am 7. Tag 0,109 µg/kg/min. Am Tag der AKI-Diagnosestellung betrug der Mittelwert der Noradrenalin-Rate bei den Patienten mit Erholung 0,097 µg/kg/min und am 7. Tag 0,019 µg/kg/min. Die Herzfrequenz unterschied sich an Tag 1 statistisch signifikant ($p = 0,033$) zwischen den beobachteten Gruppen mit einer höheren medianen Herzfrequenz bei den Patienten mit persistierendem Nierenschaden. An Tag 7 nach AKI-Diagnosestellung hatten die Patienten ohne Erholung nach AKI eine niedrigeren MAD als in der Erholungsgruppe ($p = 0,003$) mit höheren notwendigen Katecholamin-Laufraten zur Blutdruckaufrechterhaltung (Tabelle 15). Der MAD war am siebten Tag nach AKI bei den Patienten mit persistierender Nierenschädigung signifikant niedriger als bei den Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI ($p = 0,003$). An den anderen drei Zeitpunkten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem MAD in den beiden Gruppen.

Parameter	Keine Erholung			Frühe Erholung			p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
HF [Schläge/min]							
Tag 0	110 ± 27	100	52	97 ± 17	95	17	0,088
Tag 1	106 ± 24	102	50	93 ± 18	90	17	0,033
Tag 2	100 ± 21	98	49	97 ± 22	94	17	0,382
Tag 7	101 ± 22	95	43	92 ± 20	90	16	0,255
MAD [mmHg]							
Tag 0	63 ± 8	62	52	63 ± 7	61	17	0,872
Tag 1	66 ± 7	65	50	65 ± 8	62	17	0,479
Tag 2	66 ± 9	65	49	72 ± 14	70	17	0,118
Tag 7	65 ± 13	61	43	78 ± 15	81	16	0,003
Noradrenalin [µg/kg/min]							
Tag 0	0,31 ± 0,37	0,18	52	0,10 ± 0,15	0,02	18	0,007
Tag 1	0,20 ± 0,24	0,14	50	0,07 ± 0,13	0	18	0,009
Tag 2	0,18 ± 0,29	0,07	49	0,04 ± 0,08	0	18	0,017
Tag 7	0,11 ± 0,16	0,04	43	0,02 ± 0,06	0	17	0,003
Epinephrin [µg/kg/min]							
Tag 0	0,04 ± 0,08	0	52	0,004 ± 0,01	0	18	0,023
Tag 1	0,03 ± 0,06	0	50	0,003 ± 0,01	0	18	0,0496
Tag 2	0,03 ± 0,06	0	49	0,003 ± 0,01	0	18	0,060
Tag 7	0,01 ± 0,03	0	43	0,003 ± 0,01	0	17	0,508

Tabelle 15: Kreislaufspezifische Parameter

Darstellung von kreislaufspezifischen Parametern an 4 Beobachtungszeitpunkten (Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI (*acute kidney injury*)) als Mittelwerte ± Standardabweichung und als Median für nicht-parametrischen Daten. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. HF = Herzfrequenz; kg = Kilogramm; MAD = mittlerer arterieller Druck; min = Minute; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule; n = Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*); µg = Mikrogramm;

e) Parameter der Blutgerinnung und Hämoglobin

Der Quick war an Tag 0, 1 und 2 bei den Patienten ohne Erholung nach AKI signifikant niedriger als bei den Patienten mit einer schnellen Erholung (Tabelle 16). Die pTT war an den ersten drei Tagen nach AKI-Diagnosestellung bei den Patienten mit ausbleibender Erholung statistisch signifikant erhöht. Die Anzahl der Thrombozyten unterschied sich an keinem Tag signifikant. Der Hb war an Tag 0 und an Tag 1 nach AKI-Diagnosestellung bei den Patienten mit

persistierendem Nierenschaden statistisch signifikant höher (Tag 1: $p = 0,026$; Tag 1: $p = 0,047$) (Tabelle 16).

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
Quick [%]							
Tag 0	53,6 ± 13,1		53	69,1 ± 19,1		18	< 0,001
Tag 1	56,4 ± 13,0		52	71,9 ± 21,2		18	< 0,001
Tag 2	58,1 ± 13,2		50	73,4 ± 21,9		17	0,001
Tag 7	61,6 ± 13,3		43	68,6 ± 13,9		15	0,087
pTT [Sekunden]							
Tag 0	41,5 ± 18,4	35,0	53	33,1 ± 11,8	30,5	18	0,021
Tag 1	39,3 ± 14,2	35,0	51	32,2 ± 12,1	29,0	18	0,022
Tag 2	39,9 ± 11,9	38,5	50	33,2 ± 10,1	28,0	17	0,033
Tag 7	37,9 ± 12,7	35,0	43	34,4 ± 11,4	31,0	16	0,297
Thrombozyten [10⁹/µl]							
Tag 0	151 ± 113	124	53	136 ± 83	128	18	0,634
Tag 1	148 ± 124	107	51	131 ± 84	120	18	0,935
Tag 2	150 ± 135	100	50	142 ± 87	121	18	0,436
Tag 7	205 ± 123	204	43	283 ± 97	283	16	0,018
Hämoglobin [mg/dl]							
Tag 0	9,2 ± 1,2	9,0	53	8,5 ± 1,2	8,3	18	0,011
Tag 1	9,0 ± 1,2	8,8	51	8,4 ± 1,3	8,3	18	0,047
Tag 2	9,0 ± 1,1	8,8	50	8,6 ± 1,2	8,5	18	0,080
Tag 7	9,1 ± 1,3	9,3	43	9,4 ± 1,0	9,6	16	0,201

Tabelle 16: Parametern der Blutgerinnung und Hämoglobin

Darstellung der Gerinnungsparametern und des Hämoglobins an 4 Beobachtungszeitpunkten (Tag 0, 1, 2 und 7) nach AKI (*acute kidney injury*) als Mittelwerte ± Standardabweichung und Median für nicht-parametrische Daten. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. P-Werte <0,05 galten als statistisch signifikant. dl = Deziliter; mg = Milligramm; n = Anzahl der Patienten; µl = Mikroliter; pTT = partielle Thromboplastinzeit; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

3.2.4 Klinische Scores

Am Tag der AKI-Diagnosestellung lag der mediane GCS in der Gruppe ohne Erholung bei 3 und in der Gruppe der früh Erholten bei 14 (Tabelle 17). Es bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,005$) zwischen dem GCS und damit der Bewusstseinsbeschränkung zwischen beiden Gruppen. Ein statistisch

signifikant niedrigerer GCS bei den Patienten ohne Erholung war auch am ersten Tag ($p = 0,004$), am 2.Tag ($p = 0,004$) und 7. Tag ($p = 0,012$) nach AKI gegeben (Tabelle 17). Am 7. Tag lag der mediane GCS in der Gruppe der Patienten mit früher Erholung bei 15 und bei den Patienten ohne Erholung bei 10. Der APACHE-II-Score wurde einmalig am Tag der AKI-Diagnosestellung erfasst und war in der Gruppe ohne Erholung statistisch signifikant höher als in der Gruppe mit früher Erholung ($p = 0,0071$). Der SOFA-Score war an allen beobachteten Zeitpunkten bei den Patienten ohne Erholung statistisch signifikant höher als bei den erholten Patienten (Tabelle 17).

Parameter	Keine Erholung (n=53)			Frühe Erholung (n=18)			p-Wert Mittelwert ± SD
	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	Mittelwert ± SD	Median	Anzahl der Daten	
GCS							
Tag 0	7 ± 6	3	52	12 ± 4	14	18	0,005
Tag 1	8 ± 6	3	50	13 ± 4	10	18	0,004
Tag 2	9 ± 5	8	49	13 ± 4	15	18	0,004
Tag 7	10 ± 5	10	43	14 ± 3	15	17	0,012
SOFA-Score							
Tag 0	13 ± 4	14	52	9 ± 4	8	18	< 0,001
Tag 1	13 ± 5	14	50	8 ± 4	7	18	0,001
Tag 2	12 ± 5	11	49	6 ± 4	5	18	< 0,001
Tag 7	10 ± 5	9	43	4 ± 4	2	17	< 0,001
APACHE-II-Score	27 ± 10	29	52	21 ± 6	20	18	0,007

Tabelle 17: Klinische Scores

Darstellung der klinischen Scores als Mittelwerte ± Standardabweichung und als Median für nicht-parametrische Daten. Erfassung des GCS und des SOFA-Scores an 4 Beobachtungszeitpunkten (Tag 0, 1, 2 und 7) nach AKI (*acute kidney injury*) und des APACHE-Scores an Tag 0. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. APACHE = *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; GCS = *Glasgow Coma Scale*; n = Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*); SOFA = *Sequential Organ Failure Assessment*

3.2.5 Stationärer Verlauf

Die Patienten mit ausbleibender Erholung der Nierenfunktion blieben 15 Tage (Median) auf der Intensivstation und damit signifikant länger als die Patienten mit einer frühen Erholung, die im Median 7 Tage dort verblieben (Tabelle 18). In der Dauer des gesamten Krankenhausaufenthalts unterschieden sich die beiden

Gruppen nicht signifikant ($p = 0,926$). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem SCr in beiden Gruppen am Tag der Intensivstationsentlassung sowie am Tag der Krankenhausentlassung ($p = 0,807$ und $p = 0,111$). Das mediane SCr in der Gruppe der Patienten mit Erholung lag am Tag der Entlassung von der Intensivstation bei 1,50 mg/dl und am Tag der Krankenhausentlassung bei 1,35 mg/dl; in der Gruppe der Patienten, die sich früh nach AKI erholten, lag das mediane SCr zu den oben genannten Zeitpunkten bei 1,95 mg/dl und 1,19 mg/dl.

Von den Patienten ohne Erholung nach AKI mussten während des Krankenhausaufenthaltes 87 % der Patienten beatmet werden, von den Patienten mit früher Erholung 56 % der Patienten (Tabelle 18). Die Beatmung während der Operationsdauer wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die mediane Beatmungsdauer betrug bei den früh erholten Patienten 18 Stunden vs. 216 Stunden bei den nicht-erholten Patienten. Eine ausbleibende Erholung war statistisch signifikant mit einer längeren Beatmungsdauer assoziiert ($p = 0,003$). Während des Aufenthalts auf der Intensivstation benötigten 35 Patienten ohne Erholung ein Nierenersatzverfahren mit einer medianen Dauer von 69 Stunden; 18 Patienten waren nicht dialysepflichtig. Von den erholten Patienten mussten nur 4 von 18 Patienten kurzfristig dialysiert werden mit einer mittleren Dialysedauer von 6,61 Stunden ($p < 0,001$). Insgesamt wurden 39 von 71 Patienten während des gesamten Krankenhausaufenthaltes dialysiert (55 %), 66 % der Patienten ohne Erholung und 22 % der Patienten mit Erholung nach AKI (Abb. 8). Die Patienten ohne Erholung nach AKI waren statistisch signifikant häufiger ($p = 0,001$) und länger ($p < 0,001$) dialysepflichtig (Tabelle 18). Während des Aufenthalts auf der Intensivstation starben 19 Patienten, die sich nach AKI nicht erholten; weitere 2 Patienten dieser Gruppe verstarben während des Krankenhausaufenthaltes (Tabelle 18). In der Gruppe der erholten Patienten überlebten alle Patienten sowohl die Intensivstations- als auch die Krankenhausbehandlung. Insgesamt verstarben im Krankenhaus 40 % der eingeschlossenen Patienten. Es gab eine statistisch signifikante Assoziation zwischen einer ausbleibenden Erholung nach AKI und einer erhöhten Mortalität sowohl während der Behandlung auf der Intensivstation ($p < 0,001$) als auch während der Behandlung im Krankenhaus ($p < 0,001$). Von den Patienten ohne

eine Erholung nach 7 Tagen erlitten 7 Patienten während des Aufenthalts auf der Intensivstation einen Schlaganfall. Einen Herzinfarkt während der intensivmedizinischen Therapie erlitten 2 Patienten ohne Erholung und ein Patient mit früher Erholung nach AKI (Tabelle 18).

Parameter	Keine Erholung (n=53)		Frühe Erholung (n=18)		p-Wert
		Anzahl der Daten		Anzahl der Daten	
Aufenthaltsdauer ICU [Tage], Mittelwert (Median) ± SD	22 (15) ± 23	53	11 (7) ± 12	18	0,006
Aufenthaltsdauer Krankenhaus [Tage], Mittelwert (Median) ± SD	41 (26) ± 40	53	35 (23) ± 28	18	0,926
Beatmungsdauer [h], Mittelwert (Median) ± SD	291 (216) ± 326	53	181 (18) ± 392	18	0,003
Beatmung, Anzahl (%)	46 (87)	53	10 (56)	18	< 0,001
Dialyse während des Aufenthalts, Anzahl (%)	35 (66)	53	4 (22)	18	0,001
Dialysedauer [h], Mittelwert (Median) ± SD	179 (69) ± 279	53	7 (0) ± 17,8	18	< 0,001
Serum-Kreatinin [mg/dl] bei					
- ICU-Entlassung, Mittelwert (Median) ± SD	1,96 (1,50) ± 1,14	53	1,81 (1,95) ± 0,76	18	0,807
- Krankenhausentlassung, Mittelwert (Median) ± SD	1,63 (1,35) ± 0,96	53	1,13 (1,19) ± 0,37	18	0,111
RRT bei ICU-Entlassung, Anzahl (%)	28 (53)	53	0 (0)	18	< 0,001
RRT bei Krankenhaus-Entlassung, Anzahl (%)	23 (43)	53	0 (0)	18	< 0,001
Mortalität während ICU, Anzahl (%)	19 (36)	53	0 (0)	18	< 0,001
Mortalität im Krankenhaus, Anzahl (%)	21 (40)	53	0 (0)	18	< 0,001
Apoplex auf ICU, Anzahl (%)	7 (13)	53	0 (0)	18	0,180
Myokardinfarkt auf ICU, Anzahl (%)	2 (4)	53	1 (6)	18	1,0

Tabelle 18: Darstellung des stationären Verlaufs

Darstellung der Behandlungs- und Verlaufsparemeter dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) und als Median für nicht-parametrische Daten oder als Anzahl und in Prozent (%). Der Tag der Entlassung umfasst sowohl die Entlassung von der ICU oder aus dem Krankenhaus sowie ein Versterben der Patienten. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI (*acute kidney injury*). P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. dl = Deziliter; h = hour; ICU = intensive care unit; mg = Milligramm; n = Anzahl der Patienten; RRT = renal replacement therapy

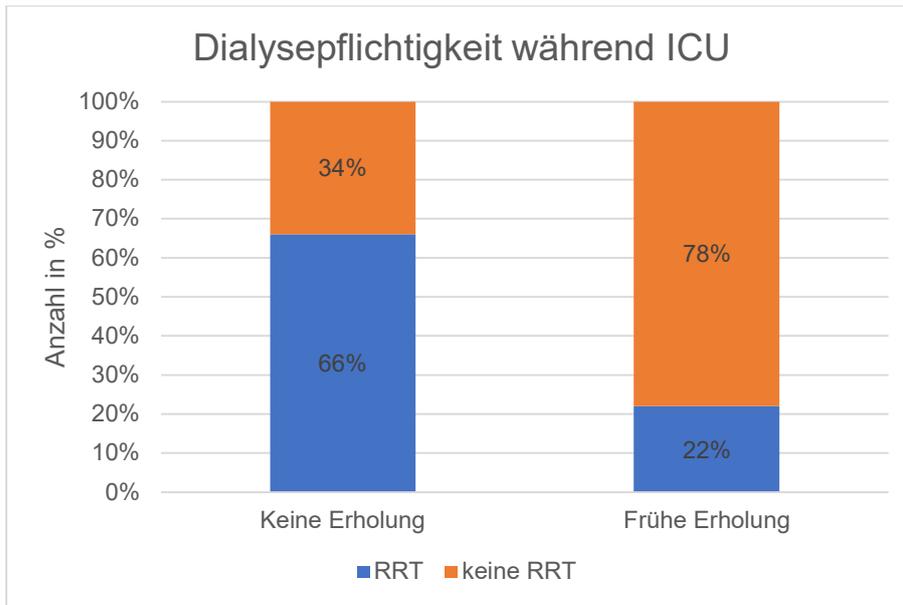


Abb. 8: Dialysepflichtigkeit während des Krankenhausaufenthaltes

Darstellung der Dialysepflichtigkeit in Prozent (%) während des Krankenhausaufenthaltes zwischen den Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion.

ICU = *intensive care unit*; RRT = *renal replacement therapy*

3.2.6 Nachbeobachtung

Von den insgesamt 71 eingeschlossenen Patienten verstarben 21 Patienten (40 %) bereits im Krankenhaus, davon 19 Patienten bereits während der intensivmedizinischen Behandlung. Aus dem Krankenhaus wurden 50 Patienten entlassen (Abb. 9). An Tag 90 nach AKI konnten 2 Patienten telefonisch nicht erreicht werden, sodass nur 48 Patienten nachbeobachtet werden konnten. Weitere 5 Patienten starben zwischen der Krankenhauserlassung und der Nachbeobachtung an Tag 90. An Tag 365 konnten somit 43 Patienten nachbeobachtet werden, 2 Patienten wurden telefonisch nicht erreicht. Somit konnte von 41 Patienten die Nachbeobachtung erfolgen. Weitere 4 Patienten starben zwischen Tag 90 und Tag 365 nach AKI (Abb. 9).

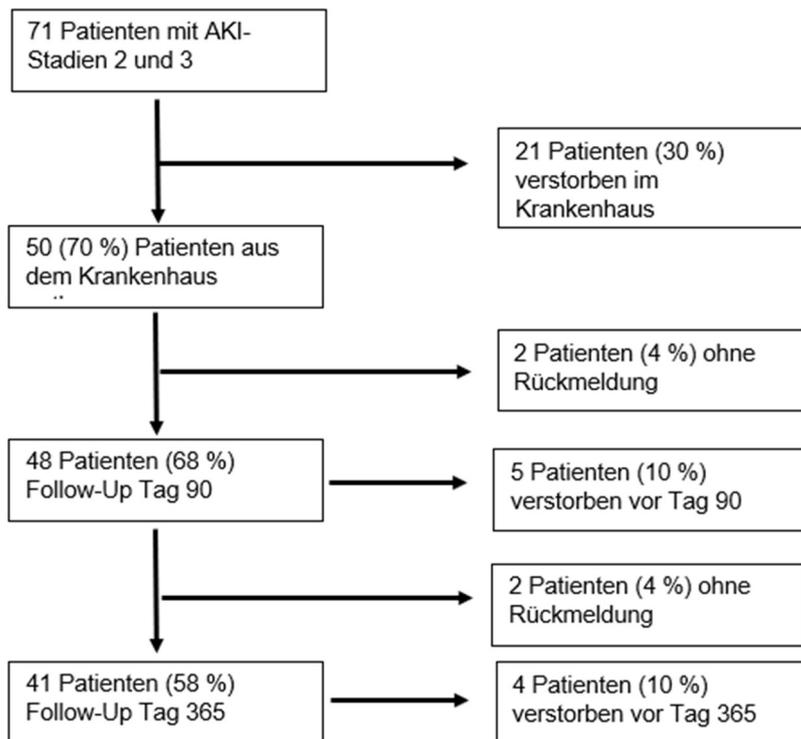


Abb. 9: Schematische Darstellung der Nachbeobachtungen (Follow-Up) der Patienten über 365 Tage

Verlauf der Nachbeobachtung der Studienpatienten bzw. Verlauf der Reduktion der Anzahl der Patienten bei Studieneinschluss, am Ende des Krankenhausaufenthaltes, an Tag 90 und an Tag 365 bedingt durch einen Studienausstieg, Versterben oder fehlende Rückmeldung.

a) Verlauf des SCr

Der Unterschied des SCr zwischen den beiden Gruppen war weder an Tag 90 noch an Tag 365 signifikant (Tabelle 19). Einer der Patienten mit initial früher Erholung nach AKI befand sich an Tag 90 erneut mit einer zweiten Episode eines AKI mit einem SCr von 3,25 mg/dl im Krankenhaus. An Tag 365 war das SCr des Patienten mit 3,78 mg/dl weiterhin deutlich erhöht. Ein weiterer Patient, der sich initial innerhalb von 7 Tagen früh erholt hatten, befand sich an Tag 365 mit einem AKI-Rezidiv in stationärer Behandlung.

b) Mortalität

An Tag 90 waren insgesamt 27 Patienten (60 %) der Gruppe der Patienten ohne Erholung verstorben; die früh erholten Patienten überlebten alle den 90. Tag nach

AKI. Innerhalb der ersten 365 Tage nach Studieneinschluss verstarben 29 Patienten (55 %) aus der Gruppe Patienten ohne Erholung nach AKI. Nur drei Patienten (17 %) aus der Gruppe der erholten Patienten starben vor Tag 365 (Abb. 10). Eine ausbleibende Erholung war sowohl an Tag 90 ($p = 0,0001$) als auch an Tag 365 ($p = 0,0051$) statistisch signifikant mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. Insgesamt 55 % aller Patienten ohne Erholung nach AKI verstarben innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung (Tabelle 19 und Abb. 10). Insgesamt betrug die Mortalitätsrate aller eingeschlossenen Patienten 45 %.

Parameter	Keine Erholung (n=53)	Anzahl der Daten	Frühe Erholung (n=18)	Anzahl der Daten	p-Wert
Kreatinin [mg/dl] an Tag 90, <i>Mittelwert (Median) ± SD</i>	1,12 (0,8) ± 0,47	24	1,12 (0,8) ± 0,66	16	0,857
Kreatinin [mg/dl] an Tag 365, <i>Mittelwert (Median) ± SD</i>	1,23 (1,13) ± 0,36	19	1,54 (1,37) ± 0,91	15	0,182
Mortalität bis Tag 90, Anzahl (%)	27 (60)	53	0 (0)	18	0,0001
Mortalität bis Tag 365, Anzahl (%)	29 (55)	53	3 (17)	18	0,0051

Tabelle 19: Nachbeobachtung der Mortalität und des Serum-Kreatinins an Tag 90 und 365
Darstellung der Ergebnisse der Nachbeobachtung der Patienten an Tag 30, 90 und 365 nach AKI (*acute kidney injury*). Darstellung der Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung und als Median für nicht-parametrische Daten oder als Anzahl und in Prozent (%). Dargestellt wurde zudem die Anzahl der erfassten Daten in beiden Gruppen zum beobachteten Zeitpunkt. Verglichen wurden die Werte zwischen den Patienten mit einer frühen und ohne Erholung nach AKI. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. dl = Deziliter; mg = Milligramm; n = Anzahl der Patienten; SD = Standardabweichung (*standard deviation*)

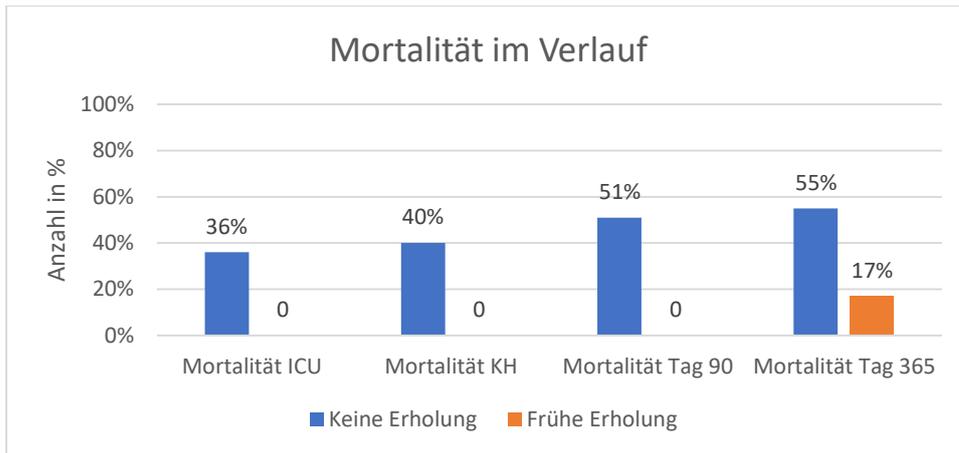


Abb. 10: Mortalität im Verlauf

Darstellung der Mortalität in % zu 4 Zeitpunkten verglichen zwischen den Patienten mit früher Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion.

ICU = *intensive care unit*; KH = Krankenhaus

Das Überleben der Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI über 365 Tage war insgesamt höher als in der Gruppe ohne Erholung der Nierenfunktion (Abb. 11). Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen einer Erholung der Nierenfunktion innerhalb von 7 Tagen nach AKI und der Überlebenschance an Tag 365 nach AKI-Diagnosestellung. Die Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI hatten eine Überlebenschance von 84 % an Tag 365, die Patienten ohne Erholung nach AKI hatten eine Überlebenschance von 45 % (Log-Rang $p = 0,005$).

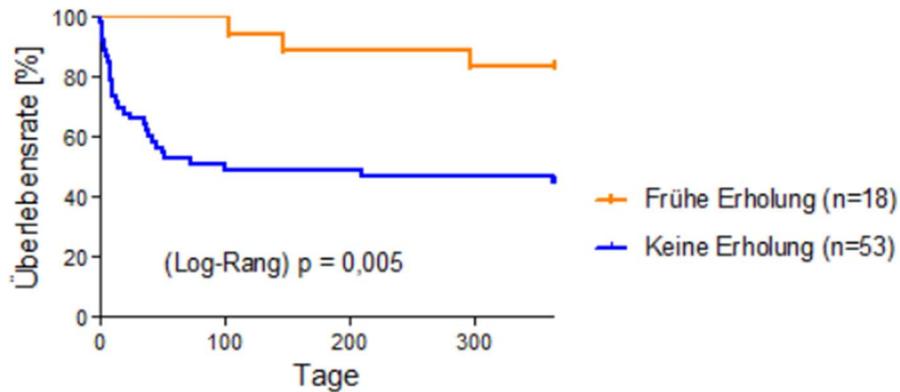


Abb. 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit an Tag 365 der Nachbeobachtung der Studienpatienten Patienten auf der operativen Intensivstation mit einer frühen Erholung der Nierenfunktion nach *acute kidney injury* innerhalb von 7 Tagen nach Diagnosestellung und Patienten mit einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. n = Anzahl der Patienten

c) MAKE

Als *Major Adverse Kidney Event* (MAKE) werden drei wichtige Endpunkte bei der Nachbeobachtung von Patienten mit AKI erfasst; die Mortalität, eine Dialysepflichtigkeit sowie eine weiterhin eingeschränkte Nierenfunktion. Die weiterhin eingeschränkte Nierenfunktion kann anhand des SCr oder der GFR bestimmt werden. An Tag 30, 90 und 365 wurden als MAKE die drei o.g. Endpunkte zusammengefasst beobachtet; eine weiterhin eingeschränkte Nierenfunktion wurde definiert als ein SCr von mehr als das 1,5fache des Baseline-SCr. Sobald ein Kriterium erfüllt war, wurde MAKE als zutreffend gewertet. In der Gruppe ohne Erholung nach AKI erfüllten am 30. Tag nach AKI-Diagnosestellung 44 Patienten mindestens eins der Kriterien, in der Gruppe der Patienten mit einer frühen Erholung nur 3 Patienten (Tabelle 20). Bei den Patienten mit persistierender AKI traten unerwünschte Ereignisse innerhalb der ersten 30 Tage nach AKI signifikant häufiger auf ($p < 0,0001$). Insgesamt erlitten 66 % der 71 Patienten mindestens eins der unerwünschten Ereignisse innerhalb der ersten 30 Tage. Bis Tag 90 erfüllten 39 % der Patienten die MAKE-Kriterien, bis Tag 365 traf mindestens eins der Kriterien auf 52 % aller Patienten zu. Zu allen drei Zeitpunkten war eine ausbleibende frühe Erholung der Nierenfunktion mit einem unerwünschten Ereignis assoziiert (MAKE 30: $p < 0,001$; MAKE 90: $p < 0,001$; MAKE 365: $p = 0,01$).

	Keine Erholung (n=53)	Frühe Erholung (n=18)	Insgesamt	P-Wert
MAKE 30, Anzahl (%)	44 (83)	3 (17)	47 (66)	< 0.001
Fehlende Daten, Anzahl (%)	0	0	0	
MAKE 90, Anzahl (%)	27 (51)	1 (6)	28 (39)	< 0.001
Fehlende Daten, Anzahl (%)	2 (4)	2 (11)	4 (6)	
MAKE 365, Anzahl (%)	32 (60)	5 (28)	37 (52)	0,01
Fehlende Daten, Anzahl (%)	4 (8)	0	4 (6)	

Tabelle 20: MAKE 30, 90 und 365

Nachbeobachtung der Patienten an Tag 30, 90 und 365 nach Diagnosestellung einer *acute kidney injury* und Vergleich zwischen den Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion. Darstellung der Ergebnisse in als Anzahl und in Prozent (%). P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Als fehlende Daten wurde die Anzahl der Patienten bezeichnet, deren Nachkontrolle aufgrund einer fehlender Rückmeldung nicht erfasst werden konnte. MAKE = *Major Adverse Kidney Event*

d) Erholung der Nierenfunktion im Verlauf

An fünf verschiedenen Zeitpunkten wurde erfasst, welche Patienten sich nach AKI erholt haben: Innerhalb der ersten sieben Tage, am Tag der Entlassung von der Intensivstation und aus dem Krankenhaus, an Tag 90 und an Tag 365 (Tabelle 21). Eine Erholung der Nierenfunktion wurde definiert als ein Rückgang des SCr auf weniger als das 1,5-fache des *Baseline*-SCr, jedoch zu verschiedenen beobachteten Zeitpunkten und unabhängig von der initialen Gruppeneinteilung. Patienten, die zum Beobachtungszeitpunkt verstorben waren oder ein Nierenersatzverfahren benötigten galten als nicht erholt. Die initiale Einteilung der Erholung der Patienten anhand des SCr innerhalb der ersten 7 Tage ist in Tabelle 21 aufgeführt, sowie die davon unabhängige Erholung an den anderen Zeitpunkten. Eine frühe Erholung (innerhalb von 7 Tagen nach AKI) zeigten 18 Patienten (25 %), 53 Patienten (75 %) galten initial als nicht erholt (Tabelle 21 und Abb. 12). Von den Patienten mit ausbleibender Erholung verstarben 7 Patienten bereits innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI-Diagnosestellung. Zum Zeitpunkt der Entlassung von der Intensivstation hatten sich von allen Patienten insgesamt nur 14 Patienten erholt, 53 Patienten galten als nicht erholt. Von den Patienten, die sich initial früh erholt hatten (innerhalb der ersten sieben Tage), zeigten im Verlauf auf der Intensivstation 11 Patienten einen erneuten Anstieg des SCr, sodass diese zum Zeitpunkt der Entlassung von der Intensivstation als nicht mehr erholt galten. Von den Patienten ohne eine frühe

Erholung innerhalb von 7 Tagen nach AKI, hatte sich das SCr am Tag der Entlassung von der Intensivstation normalisiert, sodass diese nun als erholt galten. Am Tag der Krankenhausentlassung hatten sich insgesamt 34 Patienten (48 %) erholt; darunter auch die 18 Patienten, die sich initial früh erholt hatten (innerhalb von 7 Tagen nach AKI). Insgesamt 37 Patienten hatten sich nicht erholt; davon waren 21 Patienten bereits verstorben. An Tag 90 galten ebenfalls 34 Patienten (48 %) als erholt, 33 Patienten (46 %) galten an Tag 90 als nicht erholt. Von diesen 33 Patienten ohne Erholung waren insgesamt 27 Patienten vor Tag 90 verstorben. Ein Patient, der sich initial früh erholt hatte (innerhalb von 7 Tagen nach AKI) durchlebte an Tag 90 eine erneute AKI-Episode. Bei 4 Patienten konnte der Status aufgrund fehlender SCr-Werte nicht erhoben werden. An Tag 365 nach AKI hatten sich 26 Patienten (37 %) erholt. Von den 38 Patienten (54 %) mit ausbleibender Erholung waren 32 Patienten bereits verstorben. An Tag 365 hatte ein weiterer Patient mit initial früher Erholung nach AKI eine erneute AKI-Episode und benötigte ein Nierenersatzverfahren. Der o.g. Patient, der bereits an Tag 90 als nicht erholt galt, hatte ein weiterhin erhöhtes SCr von 3,78 mg/dl und hatte sich demnach auch an Tag 365 nicht erholt. An Tag 365 konnten insgesamt 7 Patienten keiner Gruppe zugeordnet werden, da kein SCr erfasst werden konnten (Tabelle 21).

Zeitpunkt	Erholung	Keine Erholung	Keine Erholung und davon verstorben
Innerhalb von 7 Tagen, Anzahl (%)	18 (25)	53 (75)	7 (10)
ICU-Entlassung, Anzahl (%)	14 (20)	57 (80)	19 (27)
KH-Entlassung, Anzahl (%)	34 (48)	37 (52)	21 (30)
Tag 90, Anzahl (%)	34 (48)	33 (46)	27 (38)
Tag 365, Anzahl (%)	26 (37)	38 (54)	29 (41)

Tabelle 21: Erholung der Nierenfunktion im Verlauf

Darstellung der Erholung der Nierenfunktion der Patienten innerhalb von 7 Tagen, am Tag der Entlassung von der Intensivstation, am Tag der Krankenhausentlassung, an Tag 90 und an Tag 365 als Anzahl und in Prozent (%). Eine Erholung der Nierenfunktion wurde definiert als Rückgang des Serum-Kreatinins auf das 1,5fache das *Baseline*-Kreatinins zu den beobachteten neuen Zeitpunkten. In der vierten Spalte wurden die Patienten ohne Erholung erfasst, die zum beobachteten Zeitpunkt verstorben waren. ICU = *intensive care unit*; KH = Krankenhaus

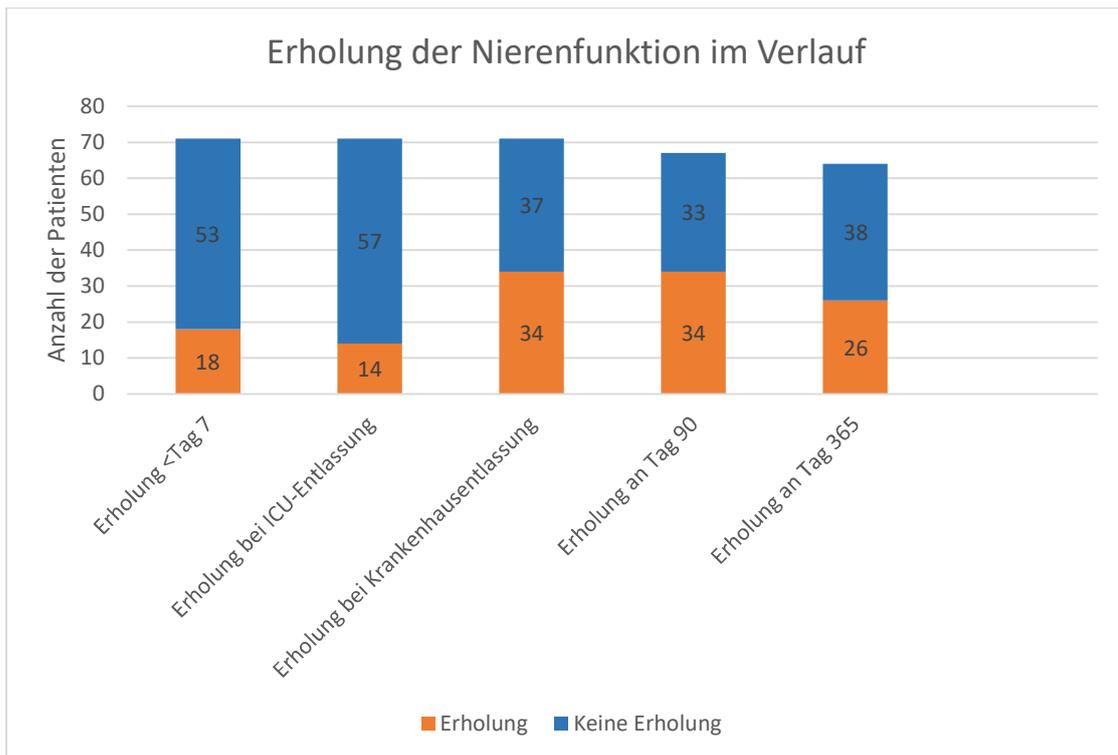


Abb. 12: Erholung der Nierenfunktion im Verlauf

Darstellung der Erholung der Nierenfunktion der Patienten innerhalb von 7 Tagen, am Tag der Entlassung von der Intensivstation, am Tag der Krankenhausentlassung, an Tag 90 und an Tag 365. Eine Erholung der Nierenfunktion wurde definiert als Rückgang des Serum-Kreatinins auf das 1,5fache das *Baseline*-Kreatinins zum jeweils beobachteten neuen Zeitpunkt.

e) Nierenersatzverfahren

Neben der Erholung zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde auch die Abhängigkeit von einem Nierenersatzverfahren erfasst. Es wurden die Patienten erfasst, die bis zum Zeitpunkt der Verlegung bzw. bis zum Versterben dialysepflichtig waren. Am Tag der ICU-Entlassung waren 26 Patienten dialysepflichtig. Von den dialysepflichtigen Patienten verstarben 14 Patienten während des ICU-Aufenthaltes und waren bis zu ihrem Tod dialysepflichtig, die anderen 12 Patienten überlebten den Aufenthalt auf der Intensivstation, waren jedoch ebenfalls weiter dialysepflichtig. Am Tag der Krankenhausentlassung waren 25 Patienten abhängig von einem Nierenersatzverfahren, wovon 17 Patienten bis zu ihrem Tod im Krankenhaus dialysiert werden mussten. Weitere 8 Patienten wurden aus dem Krankenhaus entlassen und mussten in der Weiterversorgung ebenfalls weiter dialysiert werden. An Tag 90 war ein Patient, der sich am Tag der Krankenhausentlassung bereits erholt hatte, im Rahmen

einer erneuten AKI-Episode, dialysepflichtig. An Tag 365 war ebenfalls ein Patient dialysepflichtig. Dieser Patient hatte sich initial innerhalb der ersten Woche nach AKI erholt, erlebte aber nach einem Jahr eine erneute AKI-Episode mit Abhängigkeit von einem Nierenersatzverfahren.

3.3 Analyse differentiell exprimierter miRNAs mithilfe des *Next Generation Sequencing*

Mittels NGS wurden durch QIAGEN Genomic Services in Hilden (Deutschland) Expressionsunterschiede von miRNAs im Plasma zwischen den beiden Gruppen analysiert. Dafür wurden aus beiden Gruppen der Patienten mit einer frühen Erholung und den Patienten ohne Erholung nach AKI jeweils 6 Patienten ausgewählt. Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand einer ähnlichen Ursachenverteilung für die Entstehung der AKI. Es wurden Patienten ausgewählt, die eine AKI entwickelten aufgrund von einem großen Blutverlust, aufgrund eines kardiochirurgischen Eingriffs oder einer Sepsis. In der Gruppe mit einer frühen Erholung nach AKI hatten zwei Patienten eine Sepsis, zwei erhielten einen kardiochirurgischen Eingriff und zwei Patienten erlitten einen großen Blutverlust in Kombination mit einer Kontrastmittelexposition. Von den Patienten mit ausbleibender Erholung entwickelte sich eine AKI bei vier Patienten durch einen kardiochirurgischen Eingriff und bei zwei Patienten aufgrund einer Sepsis. Für die Auswahl der Proben der Patienten mit früher Erholung nach AKI war zudem eine weiterhin bestehende Erholung an Tag 90 sowie ein Überleben der ersten 90 Tage nach AKI Voraussetzung. Die Plasmaproben der 6 Patienten an Tag 1 nach AKI wurden anschließend mittels NGS auf Expressionsunterschiede der miRNAs untersucht.

Mittels NGS generierte QIAGEN Genomic Services pro Patientenprobe im Durchschnitt 3,2 UMI-korrigierte *Reads* (Abb. 13).

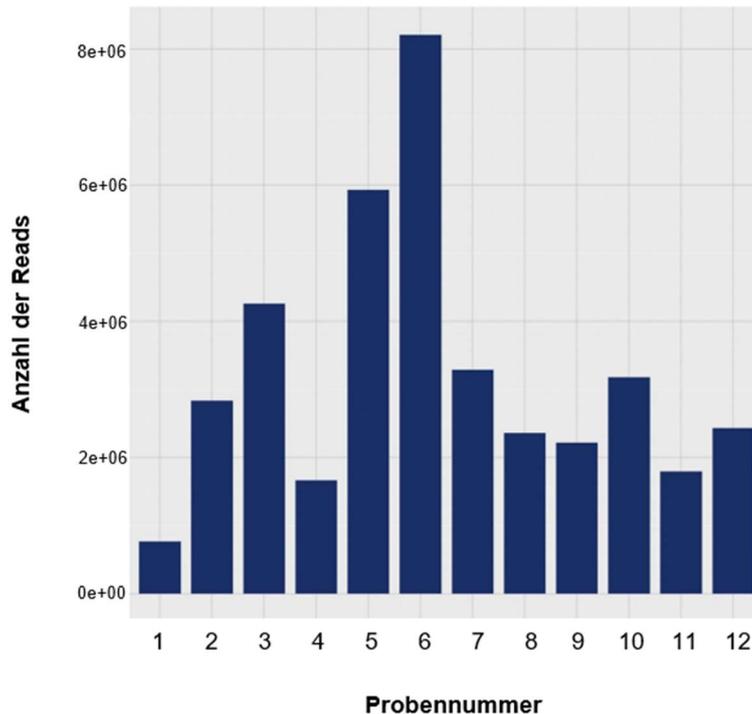


Abb. 13: UMI-korrigierte Anzahl der Reads pro Probe

Darstellung der Anzahl der *Reads* pro Probe nach Korrektur mittels *Unique Molecular Indices* (UMI). Im Durchschnitt wurden 3,2 Millionen UMI-korrigierte *Reads* pro Probe generiert. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von QIAGEN Genomic Services in Hilden (Deutschland) und anschließend modifiziert.

In Tabelle 22 sind Ergebnisse des *Mappings* für die 12 untersuchten Proben abgebildet. Die *Reads* wurden vier verschiedenen Klassen zugeordnet. Die erste Klasse beinhaltet smallRNAs bzw. miRNAs. Die zweite Klasse beinhaltet *Reads* passend zum Genom, jedoch nicht passend zu smallRNAs bzw. miRNAs. Die dritten Gruppe beinhaltete *Reads* passend zu polyA- und polyC-Polymeren sowie rRNAs und mitochondrialen RNAs. Die *Reads* der vierten Gruppe konnten nicht dem Referenzgenom zugeordnet werden.

Probennummer	UMI-korrigierte Reads, Anzahl	miRNA/ smallRNA	Genom	Sonstige	Ohne Zuordnung
1	766.288	20,3 %	19,3 %	2,1 %	57,0 %
2	2.837.290	32,8 %	16,9 %	2,5 %	45,8 %
3	4.259.677	49,6 %	12,6 %	3,1 %	32,3 %
4	1.666.693	22,8 %	19,2 %	2,6 %	53,0 %
5	5.928.811	5,6 %	39,8 %	5,3 %	48,4 %
6	8.208.452	77,6 %	8,5 %	1,6 %	10,9 %
7	3.289.180	35,8 %	17,2 %	4,1 %	41,3 %
8	2.361.419	32,2 %	15,3 %	2,4 %	47,2 %
9	2.221.298	13,0 %	20,3 %	2,9 %	61,7 %
10	3.179.539	25,5 %	15,1 %	2,0 %	55,1 %
11	1.797.950	4,3 %	27,2 %	3,6 %	63,7 %
12	2.435.411	18,0 %	20,7 %	4,0 %	54,8 %

Tabelle 21: Ergebnisse des NGS und des Mappings der Patientenproben

Zusammenfassung der Anzahl der *Reads* pro Probe generiert im *Next Generation Sequencing* (NGS) sowie die Zuordnung der *Reads* in vier verschiedene Klassen. Dem Genom wurden die *Reads* zugeordnet, die zum Referenzgenom passen, jedoch nicht passen zu miRNAs oder smallRNAs. Zu ‚Sonstige‘ wurden *Reads* passend zu polyA- und polyC-Polymeren sowie rRNA und mtRNA, zugeordnet. Die Gruppe ohne Zuordnung beinhaltet die *Reads*, die nicht dem Referenzgenom zugeordnet werden konnten. Die Daten wurden zur Verfügung gestellt von QIAGEN Genomic Services in Hilden (Deutschland). miRNA = mikroRNA; mtRNA = mitochondriale RNA, RNA = Ribonukleinsäure; rRNA = ribosomale RNA

Nach dem *Mapping* der *Reads* und dem Abgleich mit relevanten Einträgen in mirbase_20 wurde die Anzahl der bekannten miRNAs durch QIAGEN Genomic Services berechnet. Die Anzahl der *Reads* für eine bestimmte miRNA wird durch die Anzahl der gesamten *Reads* des Mappings dividiert und mit einer Million multipliziert und als TPM dargestellt (Abschnitt 2.5.1). Mittels TMM-Methode wurden die Daten zur besseren Vergleichbarkeit einer differentiellen Expression von Genen zwischen mehreren Proben normalisiert. Eine Liste von bekannten miRNAs, die anhand des NGS als differentiell exprimiert galten, sind in Tabelle 22 dargestellt. Die Tabelle zeigt die 26 miRNAs mit den größten Expressionsunterschieden zwischen den Gruppen der Patienten mit Erholung und ohne Erholung nach AKI mit einem Signifikanzlevel von 0,05 (FDR). Insgesamt 23 miRNAs waren in der Gruppe ohne Erholung nach AKI hochreguliert (Tabelle 22). Die Tabelle beinhaltet die Darstellung der Expressionsunterschiede der miRNA als logFC, die Werte nach TMM-Normalisierung für die Proben der Patienten ohne eine Erholung und mit einer frühen Erholung der Nierenfunktion, die p-Werte sowie die adjustierten p-Werte

nach Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testverfahren. Die mittels Benjamini-Hochberg adjustierten p-Werte waren identisch mit der FDR.

miRNA	logFC	Keine Erholung TMM	Frühe Erholung TMM	p-Wert	FDR
miR-122-5p	5.60	728156	15005	< 0.0001	0.0001
miR-194-5p	5.04	2549	78	< 0.0001	0.0001
miR-129-5p	4.31	20	0	< 0.0001	0.0001
miR-885-3p	4.90	348	10	< 0.0001	0.0006
miR-10a-3p	3.68	13	0	< 0.0001	0.0037
miR-885-5p	4.42	106	4	0.0001	0.0040
miR-107	2.00	486	120	0.0001	0.0043
miR-4433b-5p	-2.06	676	2822	0.0001	0.0043
miR-125b-5p	2.86	7584	1047	0.0001	0.0043
miR-378a-3p	2.92	352	46	0.0001	0.0043
miR-210-3p	3.05	124	14	0.0001	0.0043
miR-365a-3p	3.42	40	3	0.0002	0.0081
miR-34a-5p	2.99	308	38	0.0003	0.0083
miR-192-5p	2.59	1203	200	0.0003	0.0083
miR-99a-5p	2.91	138	17	0.0003	0.0083
miR-193b-5p	2.91	530	70	0.0004	0.0116
miR-365b-3p	3.58	36	2	0.0006	0.0144
miR-1306-5p	-1,55	288	845	0.0006	0.0158
miR-378a-5p	2.49	51	8	0.0009	0.0214
miR-30a-5p	1.83	2755	773	0.0011	0.0222
miR-125b-2-3p	4.37	35	1	0.0011	0.0222
miR-629-3p	-2.37	0	7	0.0013	0.0260
miR-499a-5p	2.94	20	1	0.0014	0.0260
miR-15a5p	1.58	455	153	0.0014	0.0260
miR-22-3p	1.72	943	284	0.0017	0.0304
miR-193a-5p	2.30	1597	324	0.0023	0.0374

Tabelle 22: Zusammenfassung der bekannten miRNAs mit differentieller Expression zwischen den Proben der Patienten mit früher Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion

In der Tabelle sind die 26 miRNAs abgebildet, mit den größten Expressionsunterschieden zwischen beiden Gruppen zu einem Signifikanzlevel von 0,05 (FDR), mit der logFC zwischen der Gruppe der Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion, mit rohen p-Werten, Benjamini-Hochberg-FDR-korrigierte p-Werte sowie die durchschnittlichen TMM-Werte pro Gruppe. Die Daten wurden zur Verfügung gestellt von QIAGEN Genomic Services in Hilden, Deutschland. logFC = logarithmierte *Fold Change*; miR = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure; TMM = *Trimmed Mean of M-values Normalization Method*

3.4 Netzwerkanalysen

Für die Erstellung der Netzwerkanalysen wurde durch unsere Kooperationspartner des Luxembourg Institute of Health die NCBI-Gen-Datenbank auf Gene untersucht, die mit einer akuten Nierenschädigung assoziiert sind; 356 Gene wurden identifiziert. Anschließend wurden die Datenbanken targetScan 7.2, miRWalk 3 und miRSearch V3.0 nach Einträgen durchsucht, um Paare aus den mittels NGS identifizierten miRNAs und den entsprechenden Zielgenen zu bilden (siehe Abschnitt 2.5.2). Nur die Paare, die in mindestens zwei der Datenbanken gefunden wurden, wurden für die weitere Analyse betrachtet. Insgesamt wurden 194 Paare aus miRNA und nierenassoziierten Zielgenen identifiziert (Tabelle 23).

miRNA	Anzahl der Zielgene
miR-193b-5p	42
miR-378a-3p	30
miR-193a-5p	28
miR-125b-5p	20
miR-122-5p	19
miR-34a-5p	18
miR-483-5p	11
miR-15a-5p	10
miR-107	8
miR-194-5p	6
miR-192-5p	2

Tabelle 23: Identifizierte miRNAs und die Anzahl ihrer nierenassoziierte Zielgenen

Darstellung der differentiell exprimierten miRNAs mit ihren Zielgenen, die mit einer Nierenschädigung assoziiert sind. Die Verknüpfung der miRNAs und der Zielgene erfolgte anhand von Recherche in den Datenbanken targetScan, miRWalk und miRSearch. Die Daten wurden zur Verfügung gestellt vom Luxembourg Institute of Health.

miR = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure

Anschließend wurden durch das Luxembourg Institute of Health die miRNAs mit ihren Zielgenen sowie vorhergesagten Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Genen in Netzwerkanalysen dargestellt. Für die Vorhersage möglicher Protein-Interaktionen wurde die STRING-Datenbank verwendet, um einen Überblick über Zusammenhänge sowie direkte und indirekte Interaktionen

zwischen Proteinen zu geben. Nach Erstellung der Netzwerkanalysen wurden vier vielversprechende miRNAs ausgewählt, die im NGS als differentiell exprimiert galten und mit einer Vielzahl von Zielgenen interagieren, die mit einer Nierenschädigung assoziiert sind; miR-34a-5p, miR-378a-3p, miR-193a-5p und miR-194-5p. Die Netzwerkanalysen der ausgewählten miRNAs sind in Abb. 14 und 15 dargestellt.

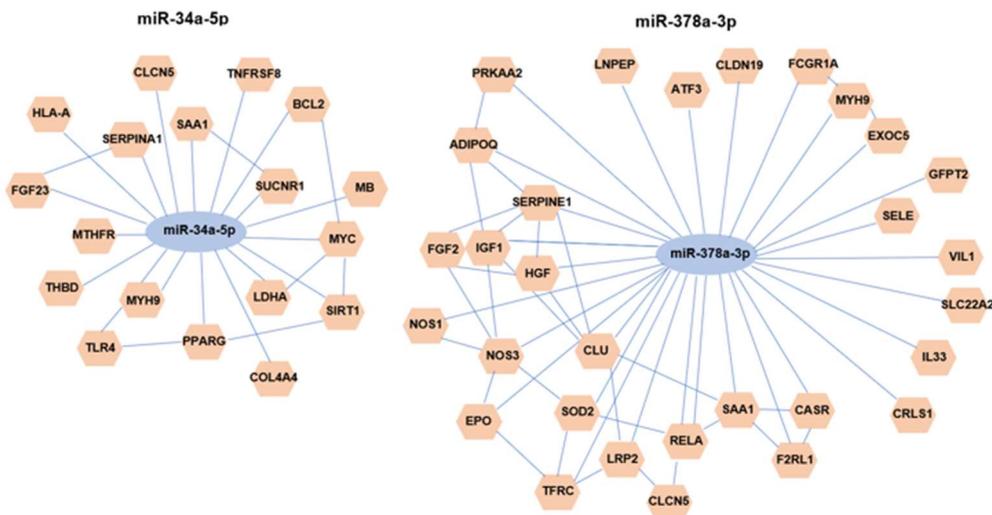


Abb. 14: Netzwerkanalyse von miR-34a-5p und miR-378a-3p

Netzwerkanalysen mit Protein-Protein-Interaktionen von miR-34a-5p und miR-378a-3p. Im Zentrum ist die jeweilige miRNA (blaue Ellipse) abgebildet, die in der Peripherie mit den nierenassoziierten Zielgenen verbunden ist (orangenes Sechseck). Zielgene, die miteinander interagieren, sind ebenfalls miteinander verbunden. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt vom Luxembourg Institute of Health und anschließend modifiziert. miRNA = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure

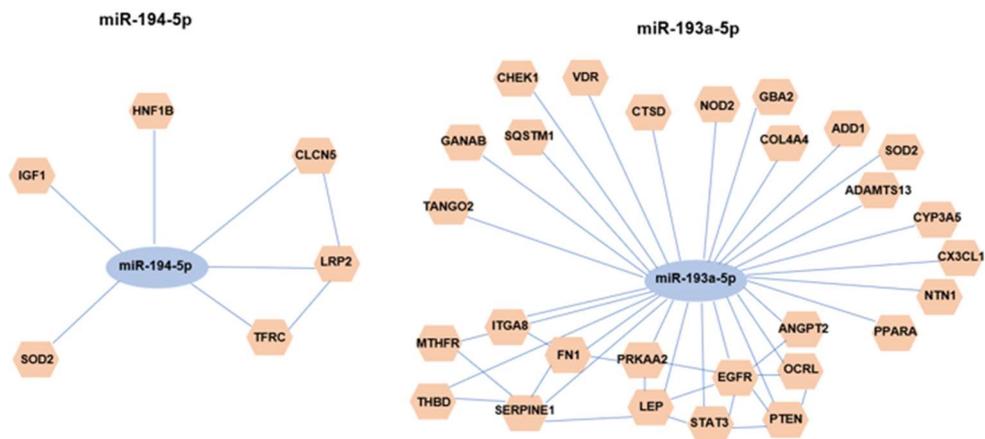


Abb. 15: Netzwerkanalyse von miR-194-5p und miR-193a-5p

Netzwerkanalysen mit Protein-Protein-Interaktionen von miR-194-5p und miR-193a-5p. Im Zentrum ist die jeweilige miRNA (blaue Ellipse) abgebildet, die in der Peripherie mit den nierenassoziierten Zielgenen verbunden ist (orangenes Sechseck). Zielgene, die miteinander interagieren, sind ebenfalls miteinander verbunden. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt vom Luxembourg Institute of Health und anschließend modifiziert.

miR = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure

Die Analyse der Anreicherung (*Fold Enrichment*) der Zielproteine sowie ihre Protein-Protein-Interaktionen mit relevanten zellulären Prozessen erfolgte mittels DAVID-Datenbank und GO-Analyse (siehe Abschnitt 2.5.2). Insgesamt 1236 Protein-Protein-Interaktionen wurden in 271 AKI-assoziierten Genen identifiziert, die entweder die Zielgene der miRNA waren oder anhand von vorhergesagten Interaktionen mit den Zielgenen assoziiert waren. Insgesamt 271 Gene waren in Inflammations-, Proliferations- oder Apoptoseprozessen angereichert. MiR-193a-5p und miR-378a-3p waren wichtige Schlüsselpunkte in den Interaktionsnetzwerken mit den meisten Verbindungen. In den Subnetzwerken waren die Gene der miR-34a-5p, miR-194-5p und 193-a-5p vor allem in Apoptose- und Proliferationsprozessen vermehrt vorhanden (Abb.16). Die Gene im Subnetzwerk der miR-378a-3p spielen eine große Rolle bei Entzündungen und Apoptose.

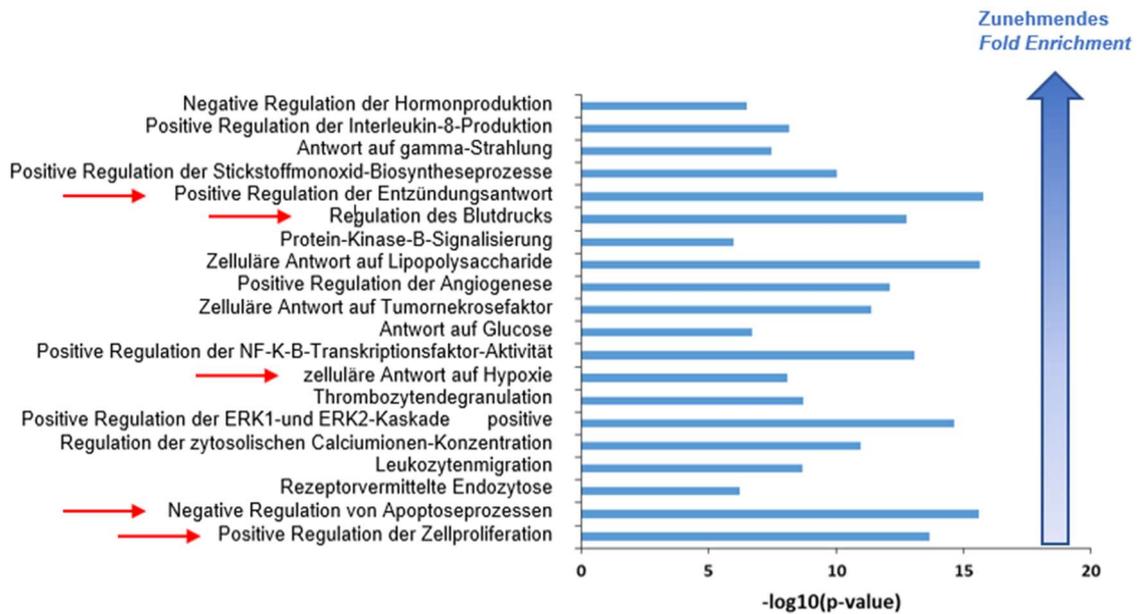


Abb. 16: Relevante biologische Prozesse mit Involvement der untersuchten miRNAs

Darstellung relevanter biologischer Prozesse mit den niedrigsten p-Werten, in die die miRNAs sowie ihre Zielproteine involviert sind. Mit roten Pfeilen sind die Prozesse markiert, in die die untersuchten miRNAs am stärksten involviert sind. Als *Fold Enrichment* wird die Überrepräsentation bzw. vermehrte Anreicherung von differentiell exprimierten Genen in biologischen Prozessen im Vergleich zu einer Referenzgruppe bezeichnet. Eine FDR (adjustierter p-Wert) von $< 0,05$ galt als statistisch signifikant. Die Daten und die Abbildung wurden zur Verfügung gestellt vom Luxembourg Institute of Health. Die Abbildung wurde anschließend modifiziert. FDR = *false discovery rate*; miRNA = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure

3.5 Quantitative *Real-Time* PCR

Anhand der Ergebnisse der Netzwerkanalysen und der *Enrichment*-Analyse wurden vier miRNAs zur qRT-PCR-Analyse ausgewählt: miR-34a-5p, miR-193a-5p, miR-194-5p, und miR-378a-3p. Diese miRNAs waren mit einer Vielzahl an relevanten renalen Proteinen assoziiert und zeigten in der *Enrichment*-Analyse die höchste Anreicherung bei relevanten biologischen Prozessen der Inflammation, Proliferation und Apoptose. Die Plasmaproben der Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI wurden mittels qRT-PCR analysiert. Es erfolgte die qRT-PCR-Analyse von 125 Proben ausschließlich extern durch TAMiRNA in Wien (Österreich). Anhand der qRT-PCR-Analyse konnten Expressionsunterschiede der untersuchten miRNAs zwischen den Gruppen mit einer frühen Erholung und ohne renale Erholung nach AKI festgestellt werden. An Tag 1 wurden in der Gruppe der früh erholten Patienten (T1 – frühe Erholung)

18 Proben mittels qRT-PCR untersucht und in der Gruppe der Patienten ohne Erholung (T1 – keine Erholung) 51 Proben. An Tag 7 nach AKI wurden 13 Plasmaproben von Patienten mit früher Erholung (T7 – frühe Erholung) und 43 Plasmaproben der Patienten mit ausbleibender Erholung (T7 – keine Erholung) analysiert. Die geringere Anzahl an Proben an Tag 7 war bedingt durch ein Fehlen der Plasmaproben aufgrund eines Versterbens der Patienten, aufgrund einer Entlassung bzw. Verlegung aus dem Krankenhaus oder aufgrund des Nichtvorhandenseins von Gefäßkathetern. Die vier untersuchten miRNAs waren im Blut der Patienten ohne Erholung am ersten Tag nach AKI statistisch signifikant vermehrt exprimiert. MiR-194-5p, miR-378a-5p und miR-34a-5p waren zu einem adjustierten p-Wert von $p < 0.001$ am 1. Tag bei den Patienten ohne Erholung nach AKI vermehrt exprimiert, miR-193a-5p zu einem adjustierten p-Wert von < 0.01 (Abb. 17). An Tag 7 nach AKI bestand zwischen den Gruppen der Patienten mit früher Erholung und den Patienten ohne Erholung kein signifikanter Unterschied mehr in der Expression der vier miRNAs. Die relative Menge der miRNAs wurden als Cq-Werte erfasst. Eine Normierung der Cq-Werte erfolgte durch *Uni-Spike-In 4* als interne Kontrolle.

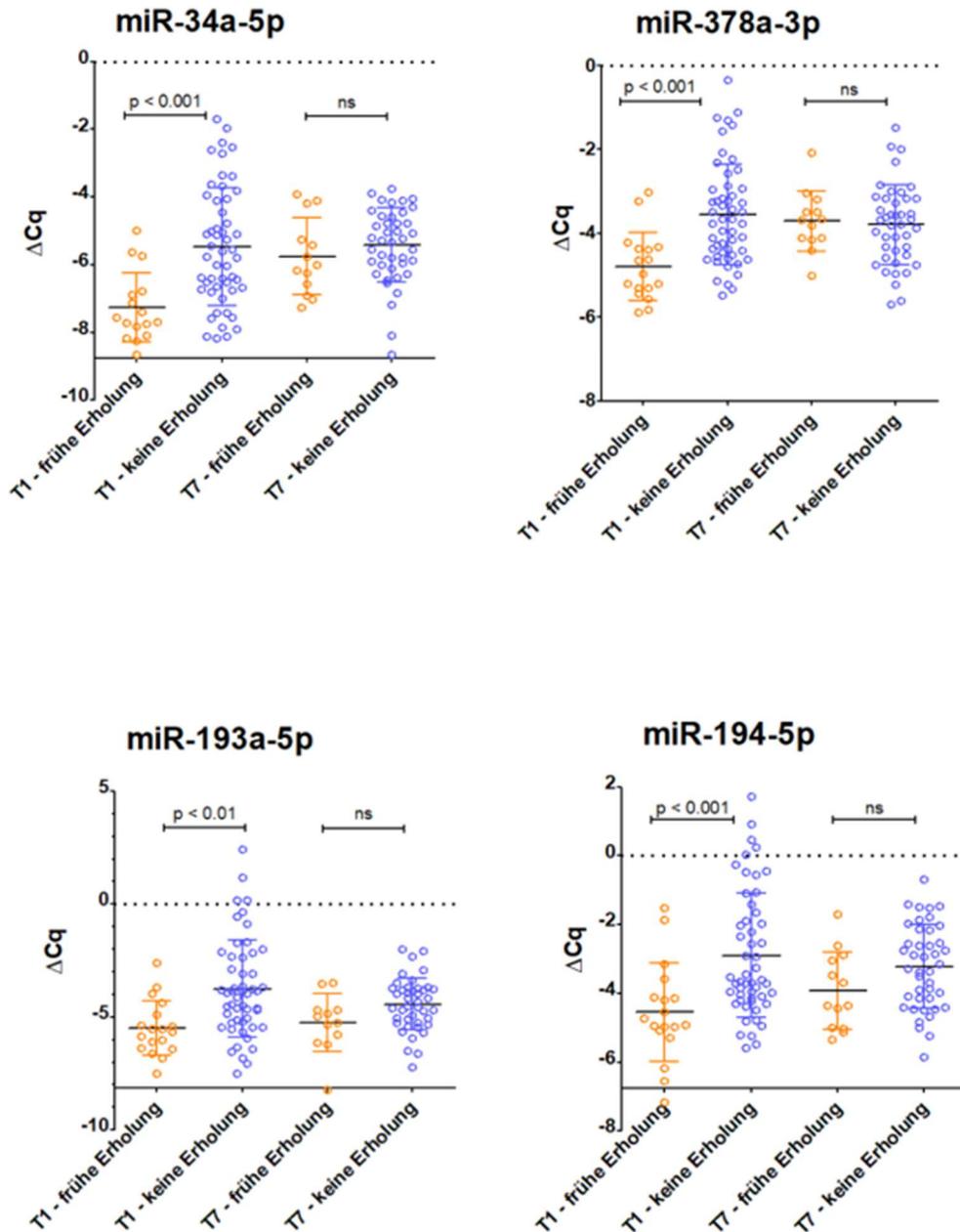


Abb. 17: Expressionsunterschiede von miR-34a-5p, miR-378a-3p, 193a-5p und miR-194-5p
 Darstellung der im qRT-PCR-Experiment identifizierten Expressionsunterschiede von miR-34a-5p, miR-378a-3p, miR-193a-5p und miR-194-5p zwischen der Gruppe mit einer frühen Erholung und ohne Erholung an Tag 1 und an Tag 7 nach *acute kidney injury*. Die p-Werte wurden mittels *Tukey's multiple comparisons*-Test adjustiert. Adjustierte p-Werte $< 0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Daten und die Abbildung wurden zur Verfügung gestellt von TAMiRNA in Wien (Österreich). Die Abbildung wurde anschließend modifiziert.
 miRNA = mikroRNA; ns = nicht signifikant; RNA = Ribonukleinsäure; $\Delta Cq = Cq_{(UniSp4)} - Cq_{(miRNA)}$; T1 = Tag 1; T7 = Tag 7

Um die prädiktive Stärke der miRNAs als Biomarker zu charakterisieren, wurden durch TAMiRNA ROC-Analysen durchgeführt und die AUC berechnet. Die statistische Analyse der qRT-PCR-Ergebnisse mit p-Werten, adjustierten p-

Werten für multiple Testverfahren und der ROC-Kurven ist in Tabelle 24 zusammengefasst.

miRNA	Zeitpunkt	p-Wert	AUC	adj. p-Wert
miR-378a-3p	t1	0,00097	0,76	0,02
miR-378a-3p	t7	0,71	0,54	0,81
miR-34a-5p	t1	0,00021	0,80	0,02
miR-34a-5p	t7	0,055	0,68	0,14
miR-194-5p	t1	0,0006	0,77	0,02
miR-194-5p	t7	0,04	0,69	0,12
miR-193a-5p	t1	0,00048	0,78	0,02
miR-193a-5p	t7	0,03	0,71	0,10

Tabelle 24: Statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse

In der Tabelle ist die statistische Auswertung der differentiellen Expression der miRNAs zwischen den Patienten mit einer frühen Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion nach *acute kidney injury* dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test (p-Wert), mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Testverfahren (adj. p-Wert) sowie der AUC. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant. Die Daten wurden zur Verfügung gestellt von TAmiRNA in Wien (Österreich). adj.p-Wert = adjustierter p-Wert, AUC = *area under the curve*; miRNA = mikroRNA; RNA = Ribonukleinsäure; t = Zeitpunkt

Die Expression der miR-34a-5p war an Tag 1 nach AKI in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI statistisch signifikant erhöht ($p = 0,00021$), mit einem adjustierten p-Wert = 0,02 (Tabelle 24 und Abb. 18). Ein erhöhtes Plasmalevel von miR-34a-5p and Tag 1 nach AKI galt als bester univariater prädiktiver Wert für eine ausbleibende Erholung 7 Tage nach AKI mit einer AUC von 0,80. An Tag 7 nach AKI gab es keinen signifikanten Unterschied in der Expression der miR-34a-5p zwischen den beiden Gruppen (adjustierter p-Wert = 0,14). An Tag 7 nach AKI betrug die AUC der miR-34a-5p als prädiktiver Marker für eine Erholung nach AKI 0,68 ohne signifikanten Unterschied.

Die Expression der miR-378-3p war an Tag 1 nach AKI in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI statistisch signifikant erhöht ($p = 0,00097$), mit einem adjustierten p-Wert = 0,02 (Tabelle 24 und Abb. 19). An Tag 1 nach AKI betrug die AUC der miR-378a-3p als prädiktiver Marker für eine ausbleibende Erholung nach AKI 0,76. An Tag 7 nach AKI gab es keinen signifikanten Unterschied in der Expression der miR-378a-3p zwischen den beiden Gruppen (adjustierter p-Wert = 0,81). An Tag 7 nach AKI betrug die AUC der miR-378-3p

als prädiktiver Marker für eine ausbleibende Erholung nach AKI 0,54 ohne signifikanten Unterschied.

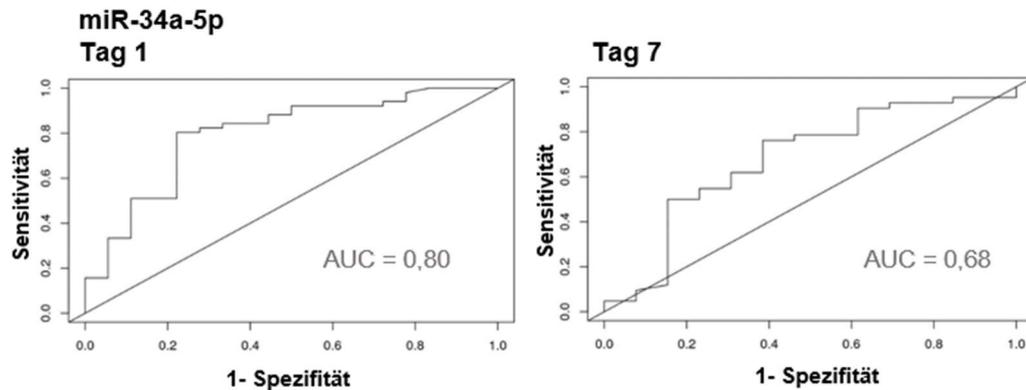


Abb. 18: ROC-Kurven der miR-34a-5p an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI

ROC-Kurven und die AUC der miR-34a-5p im Blut von Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI (*acute kidney injury*) für die Prädiktion einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion zu einem adjustierten p-Wert von $p=0,02$ für Tag 1 und $p = 0,14$ an Tag 7. P-Werte $< 0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Daten und Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt von TAmiRNA in Wien (Österreich). Die Abbildungen wurden modifiziert. AUC = *area under the curve*; miR-34a-5p = mikroRNA-34a-5p; RNA = Ribonukleinsäure

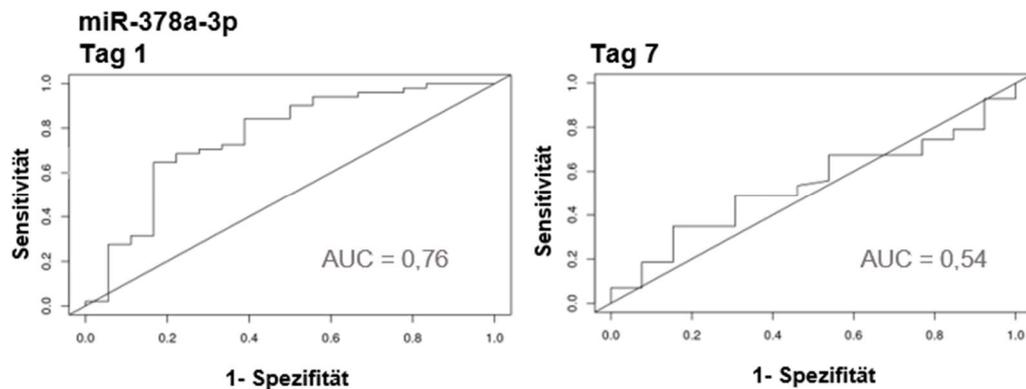


Abb. 19: ROC-Kurven der miR-378a-3p an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI

ROC-Kurven und die AUC der miR-378a-3p im Blut von Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI (*acute kidney injury*) für die Prädiktion einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion zu einem adjustierten p-Wert von $p = 0,02$ für Tag 1 und $p = 0,81$ an Tag 7. P-Werte $< 0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Daten und Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt von TAmiRNA in Wien (Österreich). Die Abbildungen wurden modifiziert. AUC = *area under the curve*; miR-378a-3p = mikroRNA-378a-3p; RNA = Ribonukleinsäure

Die miR-193a-5p war an Tag 1 nach AKI in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI statistisch signifikant erhöht ($p = 0,00048$), der adjustierte p-Wert betrug $p = 0,02$ (Tabelle 24 und Abb. 20). An Tag 1 nach AKI betrug die AUC der miR-193a-5p als prädiktiver Marker für eine ausbleibende Erholung nach AKI 0,78. An Tag 7 nach AKI bestand kein signifikanter Unterschied mehr in der Expression der miR-193a-5p im Plasma der Patienten. Nach Korrektur für multiple Testverfahren ergab sich für Tag 7 ein adjustierter p-Wert von 0,10. An Tag 7 nach AKI betrug die AUC der miR-193a-5p als prädiktiver Marker für eine ausbleibende Erholung nach AKI 0,71 ohne signifikanten Unterschied.

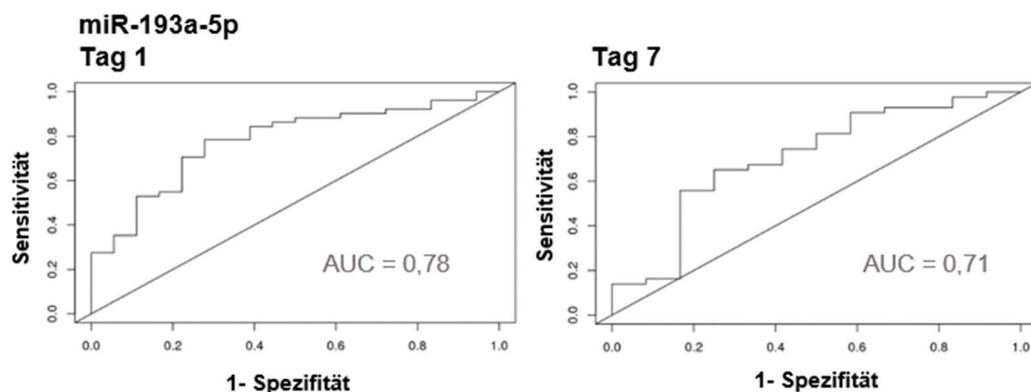


Abb. 20: ROC-Kurven der miR-193a-5p an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI

ROC-Kurven und die AUC der miR-193a-5p im Blut von Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI (*acute kidney injury*) für die Prädiktion einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion zu einem adjustierten p-Wert von $p = 0,02$ für Tag 1 und $p = 0,10$ an Tag 7. P-Werte $< 0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Daten und Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt von TAmiRNA in Wien (Österreich). Die Abbildungen wurden anschließend modifiziert. AUC = *area under the curve*; miR-193a-5p = mikroRNA-193a-5p, RNA = Ribonukleinsäure

MiR-194-5p war an Tag 1 nach AKI im Plasma der Gruppe der Patienten ohne Erholung statistisch signifikant erhöht ($p = 0,0006$), mit einem adjustierte p-Wert von 0,02 (Tabelle 24 und Abb. 21). Der prädiktive Nutzen der miR-194-5p für eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion lag bei einer AUC von 0,77. Am 7. Tag nach AKI gab es zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Expressionsunterschied der miR-194-5p im Plasma der Patienten (adjustierter p-Wert bei multiplen Testverfahren = 0,12). Die AUC an Tag 7 lag bei 0,69 ohne signifikanten Unterschied.

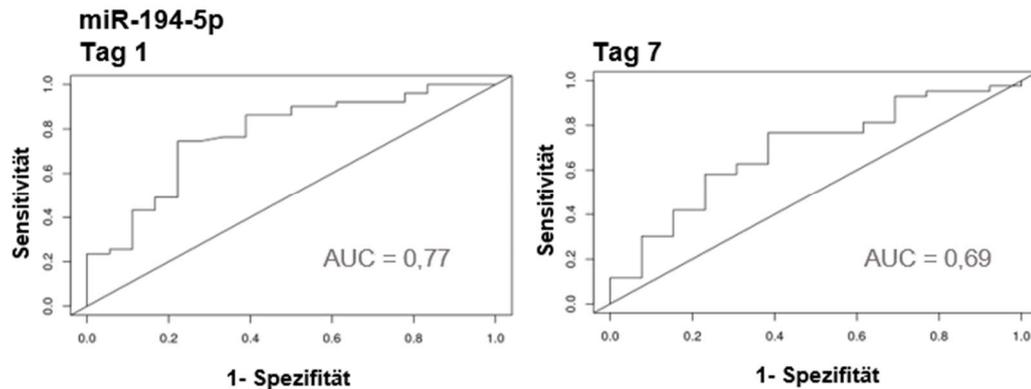


Abb. 21: ROC-Kurven der miR-194-5p an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI

ROC-Kurven und die AUC der miR-194-5p im Blut von Patienten an Tag 1 und an Tag 7 nach AKI (*acute kidney injury*) für die Prädiktion einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion zu einem adjustierten p-Wert von $p = 0,02$ für Tag 1 und $p = 0,12$ an Tag 7. P-Werte $<0,05$ galten als statistisch signifikant. Die Daten und Abbildungen wurden zur Verfügung gestellt von TAmiRNA in Wien (Österreich). Die Abbildungen wurden anschließend modifiziert. AUC = *area under the curve*; miR-194-5p = mikroRNA-194a-5p; RNA = Ribonukleinsäure

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die miR-34a-5p, miR-193a-5p, miR-194-5p, und miR-378a-3p aus dem Plasma von Patienten mit ausbleibender renaler Erholung nach höhergradiger AKI am ersten Tag statistisch signifikant hochreguliert waren. An Tag 7 nach AKI bestand kein signifikanter Unterschied in der Expression der oben genannten miRNAs zwischen den Patienten mit einer frühen Erholung und Patienten mit einer persistierenden AKI.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte die Rolle von miRNAs bei der Erholung der Nierenfunktion nach AKI. Mittels NGS wurde auf Expressionsunterschiede von miRNAs im Blut von Patienten mit früher Erholung und ohne Erholung der Nierenfunktion gescreent. Mittels qRT-PCR wurde untersucht, ob die miRNAs miR-34a-5p, miR-193a-5p, miR-194-5p, und miR-378a-3p im Blut von Patienten mit höhergradiger AKI als prädiktive Marker für eine Erholung der Nierenfunktion dienen können. Zudem wurden relevante klinische Patientendaten, Laborparameter und der stationäre Behandlungsverlauf erfasst. Die Erholung der Nierenfunktion, unerwünschte Ereignisse sowie die Mortalität nach AKI wurden über 365 Tage erfasst und nachbeobachtet.

4.1 Methodik

4.1.1 Studiendesign

In der Studie wurden die Daten einer Kohorte von 71 Patienten aus einem Zentrum präsentiert. Es wäre wichtig, die Ergebnisse in größeren multizentrischen Studien zu validieren. In diese Studie wurden Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation eingeschlossen; viele davon erhielten einen kardiochirurgischen Eingriff und waren multimorbide. Somit zeigt diese Studie keinen ausreichend großen Querschnitt durch das kritisch kranke Patientengut. Da es sich in dieser Studie um eine Beobachtungsstudie handelt, können wir eine Kausalität zwischen der Erholung nach AKI und dem Auftreten unerwünschter Ereignissen während der Nachbeobachtung nicht sicher herstellen. In dieser Zeit kann das Auftreten von *Confoundern* nicht ausgeschlossen werden und ist vielmehr sogar wahrscheinlich. Eine weitere Limitation der Studie ist die Auswahl des Patientenkollektivs. Die Entstehung der AKI ist multifaktoriell [129]; in unserer Studie entwickelten die meisten Patienten eine AKI im Rahmen eines kardiochirurgischen Eingriffs oder einer Sepsis. Da ausschließlich die Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation eingeschlossen wurden, könnte es einen Bias in der Häufigkeitsverteilung der

Ursache für eine AKI geben. Eine AKI bedingt durch einen chirurgischen (insbesondere kardiochirurgischen) Eingriff könnte überrepräsentiert sein. Da viele miRNAs ubiquitär vorkommen und mit unterschiedlichsten biologischen Prozessen assoziiert sind, könnten in nachfolgenden Studien die Patientengruppen in kleinere Subgruppen anhand der Entstehung der AKI unterteilt werden. Somit könnten spezifischere miRNAs untersucht werden und potenzielle Störfaktoren minimiert werden. In nachfolgenden Studien könnten die Expressionsunterschiede von miRNAs beispielsweise ausschließlich bei septischer AKI oder bei CSA-AKI untersucht werden, da eine Sepsis und große Operationen häufige Ursachen für die Entstehung einer AKI darstellen [4, 129, 130]. In der vorliegenden Studie entwickelten 38 % der Patienten eine AKI aufgrund einer kardiochirurgischen Operation, 21 % der Patienten aufgrund einer Sepsis. Diese Studie dient als Pilotstudie zur Identifikation von miRNAs bei AKI und von Expressionsunterschieden der miRNAs zwischen Patienten mit einer frühen Erholung und Patienten ohne eine Erholung nach AKI. Durch die Ergebnisse des NGS und der Netzwerkanalysen aus dieser Studie ist bereits eine geeignete Vorbereitung für eine multizentrische Nachfolgestudie erfolgt. Für die Untersuchung der Expressionsunterschiede der miRNAs in beiden Gruppen wurden Plasma- und Urinproben der Patienten gewonnen. Bisher konzentriert sich diese Arbeit auf die Analyse von miRNAs im Plasma. Eine zusätzliche Bestimmung der miRNAs aus dem Urin wäre damit möglich und wichtig und soll in Nachfolgestudien erfolgen. Damit wäre eine bessere Vergleichbarkeit mit vielen bereits untersuchten Biomarkern geschaffen, die ebenfalls aus dem Urin bestimmt werden [49, 131, 132]. CCL 14 aus dem Urin von Patienten mit AKI auf der Intensivstation konnte in der RUBY-Studie eine persistierende AKI vorhersagen [71]. Im letzten Jahr zeigten Newbury et al., dass miR-141 in Urinproben von Patienten ohne eine Erholung der Nierenfunktion nach AKI signifikant vermehrt exprimiert war im Vergleich zu Patienten mit einer Erholung der Nierenfunktion und im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten [131]. Da allerdings eine Reduktion der Urinproduktion oder eine Anurie während einer AKI-Episode das Gewinnen von Urinproben erschweren kann, stellt die Bestimmung der miRNAs im Plasma von Patienten eine sichere Alternative dar.

4.1.2 Definition von AKI und renaler Erholung

Da es aktuell keine Kreatinin-unabhängige, einheitliche Definition für die AKI gibt, wurde in dieser Arbeit die Definition der KDIGO-*Guidelines* [4] zur Diagnosestellung verwendet. Eine neuere, Kreatinin-unabhängige Definition könnte die Ergebnisse dieser Studie beeinflussen. Auch das Fehlen einer einheitlichen Definition für die Erholung der Nierenfunktion erschwert die akkurate Erfassung der Epidemiologie einer Erholung nach AKI sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien. In dieser Arbeit wurde die Erholung der Nierenfunktion definiert als einen Rückgang des SCr innerhalb von 7 Tagen auf weniger als das 1,5fache des *Baseline*-SCr. Newbury et al. untersuchten die Rolle von miR-141 bei der Erholung der Nierenfunktion nach AKI [131]. Sie definierten eine renale Erholung als einen Rückgang des SCr zum *Baseline*-SCr bzw. einen Rückgang des SCr auf den Maximalwert des SCr des AKI-Stadiums 1 nach KDIGO [4] an Tag 90 nach AKI [131]. Arreger et al. [133] untersuchten den prognostischen Nutzen von IGFBP-7 im Urin als Marker für eine frühe Erholung nach AKI. Es wurde unterschieden zwischen einer frühen Erholung innerhalb von 7 Tagen, einer späten Erholung nach 7 Tagen und einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion. Eine Erholung wurde definiert als ein Rückgang zu den *Baseline*-RIFLE-[2]Kriterien. Meersch et al. definierten in einer Studie über Biomarker der Erholung der Nierenfunktion bei kardiochirurgischen Operationen eine Erholung der Nierenfunktion als einen Rückgang des SCr am Tag der Krankenhausentlassung auf das gleiche oder ein geringeres Level als das präoperative SCr [49]. Die Verwendung der KDIGO-Kriterien [4] für eine AKI und für die Erholung nach AKI bei unbekanntem *Baseline*-SCr könnte zu einer Fehleinschätzung der renalen Erholung führen [134]. In unserer Studie wurde als *Baseline*-SCr ein erfasster SCr-Wert zwischen 6 Monaten und einem Tag vor AKI-Diagnosestellung verwendet. Bei allen 71 Patienten konnte so ein *Baseline*-SCr erfasst werden. Häufig ist jedoch eine Erfassung des *Baseline*-SCr nicht möglich. In diesem Fall kann eine Gleichung zur Abschätzung des *Baseline*-SCr, die *Modification of Diet in Renal Disease*-(MDRD)Gleichung [135], verwendet werden. Diese dient der Berechnung des SCr anhand einer bekannten GFR, der Rasse, des Geschlechts und des Alters der Patienten. Diese Formel kann modifiziert werden durch eine Normalisierung der GFR für alle Patienten zwischen 75 und 100 ml/min pro 1,73 m²

Körperoberfläche [136]. Mit dem Einsatz dieser geschätzten GFR kann das *Baseline*-SCr berechnet werden. Die Verwendung dieser allgemeinen Gleichung könnte jedoch ebenfalls zu einer Über- oder Unterschätzung der renalen Erholung führen, da weder ein vorbestehender Nierenschaden noch eine besonders gute Nierenfunktion berücksichtigt werden. Auch eine Abnahme der Muskelmasse bei kritisch kranken Patienten mit folglich potenziell erniedrigtem SCr könnte zu einer Verzerrung in der Einschätzung der Erholung führen [64]. Somit ist die Rückrechnung des *Baseline*-SCr durch die o.g. Formel vor allem für nierengesunde Studienpopulationen geeignet [5]. Neben den Kriterien für die Definition der Erholung der Nierenfunktion spielt auch die Rolle des Zeitpunktes für die Erfassung eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurde eine frühe Erholung innerhalb von 7 Tagen nach AKI beobachtet. Viele andere Studien konzentrierten sich auf eine renale Erholung am Tag der Krankenhausentlassung [70, 137, 138]. Eine einheitliche Definition der Erholung der Nierenfunktion und des Zeitpunktes der Erholung könnte in der Zukunft die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Studien zu AKI verbessern.

4.1.3 CRF

Die klinischen Daten der Patienten wurde in einer anonymisierten Form in CRFs erfasst. Da einige Patienten bereits während des Krankenhausaufenthalts verstarben oder auf eine Normalstation verlegt wurden, wurden einige Labordaten und Parameter nicht an jedem Zeitpunkt beobachtet, sodass in der statistischen Auswertung die Anzahl der Parameter variieren.

4.1.4 NGS

NGS ist eine Methode, bei der, im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, mehreren Millionen DNA-Fragmente innerhalb kürzester Zeit parallel sequenziert werden können [116]. Die Sanger-Sequenzierung [139] wurde in den 1970er Jahren veröffentlicht und galt für ca. 30 Jahre als die führende Methode der DNA-Sequenzierung. Eine Weiterentwicklung und Automatisierung der Sanger-Methode ermöglichte 2004 die Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms [140]. Seit 2005 wurden viele verschiedene NGS-Methoden

veröffentlicht [141-143]. Vorteile des NGS im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung ist zu einem die Schnelligkeit und die reduzierten Kosten, zum anderen auch die große Menge an DNA-Fragmenten, die parallel sequenziert werden können [144]. Mittels NGS kann ein gesamtes menschliches Genom, verglichen mit einem Referenzgenom, sequenziert werden, sodass bisher unbekannte Mutationen oder Gene, assoziiert mit Krankheitsentstehung, entdeckt werden können [116]. Die Firma Illumina ist mit seinen NGS-Systemen ein dominanter Vertreter des heutigen Sequenzierungs-Marktes [145]. In dieser Arbeit erfolgte das NGS extern durch QIAGEN Genomic Services in Hilden (Deutschland) mittels NextSeq500 von Illumina. Die Rolle des NGS im klinischen Setting, zur Diagnostik von Krankheiten sowie zur Etablierung von Biomarkern der Krankheitsentwicklung, nimmt immer weiter zu [146]. In der Krebsforschung ist der Einsatz von NGS zur RNA-Sequenzierung und zur Identifikation von miRNAs bereits weit verbreitet [147-150].

4.1.5 qRT-PCR

Ein Grund für das Potenzial von miRNAs als Biomarker beruht auf ihrer Stabilität in Geweben und Körperflüssigkeiten, z.B. in Serum und Urin sowie bei der Lagerung bei Raumtemperatur [103-106]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasmaproben der Patienten ausschließlich über liegende Katheter entnommen, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Somit unterschied sich die Lagerungszeit der Proben teilweise um mehrere Monate. Auch wenn miRNAs als stabil gelten, kann eine Beeinflussung der Ergebnisse – wenngleich unwahrscheinlich - durch unterschiedlich lange Lagerung bei -80 °C nicht sicher ausgeschlossen werden. MiRNAs können verlässlich mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert werden und bieten aufgrund ihrer Analyse anhand von Sequenzen eine hohe Spezifität [107]. Die hohe Geschwindigkeit kombiniert mit hoher Sensitivität und Spezifität macht die qRT-PCR zu einem wichtigen und beliebten Werkzeug der Quantifizierung von Nukleinsäuren [151]. Um die Ergebnisse von qRT-PCR-Versuchen besser vergleichen und reproduzieren zu können, entwickelten Bustin et al. [151] die *MIGQ-Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments)* zur Publikation von qRT-PCR-Experimenten. Eine genaue Dokumentation der

Probengewinnung, der einzelnen Versuchsabläufe, der Qualitätskontrolle und der Normalisierung der Ergebnisse anhand einer Checkliste soll die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der qRT-PCR-Experimente verbessern [151]. Die vielen Schritte vor und während der qRT-PCR gelten als potenzielle Stellen für Fehler. Pipettier- Ungenauigkeiten, Kontaminationen, sowie Unterschiede in der Entnahme und Lagerung der zu untersuchenden Proben sind nur wenige Beispiele für mögliche Probleme bei der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von PCR-Experimenten [152]. TAMiRNA in Wien fügte den Plasmaproben unserer Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten *Spike-In*-Kontrollen hinzu (bei der RNA-Extraktion, der cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation). Diese Kontrollen ermöglichen eine Normalisierung und Überprüfung der technischen Varianz der Probenentnahme und der Probenqualität, der RNA-Extraktion, der RT sowie der PCR-Amplifikation. In Zukunft sind weitere Untersuchungen zur Verbesserung von Normalisierungsmethoden notwendig. Proben mit großen Expressionsunterschieden von miRNAs scheinen robust, jedoch kann bei geringen Expressionsunterschieden eine unzureichende Normalisierung die Ergebnisse stark beeinflussen [153]. Schon diese kleinen Veränderungen im Expressionsmuster von miRNAs könnten eine wichtige Rolle spielen, da miRNAs auf einem einzigen Signalweg viele Angriffspunkte und somit auch viele biologische Prozesse beeinflussen können [153]. Die Ähnlichkeit der vielen verschiedenen miRNAs kann das Erreichen einer ausreichenden Spezifität von Experimenten erschweren [154]. Zu komplexe Versuchsabläufe und zu hohe Kosten können Standardlabore unter Umständen nicht leisten [155]. QRT-PCR-Versuche zur Detektion von Expressionsunterschieden von miRNAs bedürfen einer gründlichen Dokumentation und standardisierten Normalisierung bzw. Interpretation, um die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten [151]. MiRNAs werden nicht nur als diagnostische, sondern auch als potenzielle therapeutische Angriffspunkte diskutiert [156, 157]. Für einen sicheren Einsatz von miRNAs zu therapeutischen Zwecken oder zur routinemäßigen Diagnostik im klinischen Alltag, wird ein effizientes und kostengünstiges Verfahren benötigt. Trotz zunehmender Versuche zu Expressionsmustern von miRNAs, fehlt aktuell ein einheitlicher Konsens zur miRNA-Quantifizierung und Standardisierung [158].

Um eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus unserer Kohorte in möglichen multizentrischen Folgestudien ausreichend gewährleisten zu können, wurden die qRT-PCR-Experimente von TAmiRNA in Wien durchgeführt.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Klinische Daten

In vielen Studien wurde gezeigt, dass ältere Patienten ein höheres Risiko für die Entwicklung einer AKI sowie für ein schlechteres Outcome nach AKI haben [65, 159]. Auch das weibliche Geschlecht wird in den *KDIGO-Guidelines* als ein Prädispositionsfaktor für die Entwicklung einer AKI erfasst [4]. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied im Alter zwischen den Gruppen der Patienten mit Erholung und ohne Erholung nach AKI festgestellt werden. Das mediane Alter der erholten Patienten lag mit 73 Jahren sogar etwas über dem medianen Alter der Patienten ohne Erholung mit 68 Jahren und eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Geschlecht und einer Erholung nach AKI konnten wir ebenfalls nicht nachweisen. In dem beobachteten Zeitraum wurden insgesamt weniger weibliche Patientinnen als männliche Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Studienpopulation bestand aus nur 19 Frauen (27 %). Der Großteil der Patienten mit AKI in dieser Studie waren männlich (73 %). Neben dem Alter und dem Geschlecht gelten auch Vorerkrankungen wie eine chronische Nierenerkrankung, ein Diabetes mellitus oder eine maligne Tumorerkrankung in der Vorgeschichte als Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung [4, 160]. Komorbiditäten, wie ein Diabetes mellitus, ein arterieller Hypertonus und kardiale Vorerkrankungen sind zudem häufig berichtete Risikofaktoren für eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion nach AKI [161, 162]. In dem Patientenkollektiv aus dieser Arbeit litten insgesamt 25 % der Patienten an einem Diabetes mellitus, 21 % der Patienten an einer chronischen Nierenerkrankung und 34 % der Patienten hatten eine maligne Tumorerkrankung in der Vorgeschichte oder zur Zeit des Intensivstationsaufenthalts. Ein Diabetes mellitus, ein arterieller Hypertonus

sowie eine CKD waren bei den Patienten ohne Erholung nach AKI ähnlich oft vertreten wie bei den Patienten, die sich erholt haben. Von den erholten Patienten waren 33 % der Patienten Diabetiker, 61 % litten an einem arteriellen Hypertonus und 22 % an einer CKD. Bei den Patienten mit persistierender Nierenschädigung waren 36 % der Patienten Diabetiker, 64 % Hypertoniker und 21 % waren bereits vorher chronisch niereninsuffizient. Von den Patienten ohne eine Erholung der Nierenfunktion litten 36 % der Patienten an einer Herzinsuffizienz, während nur 22 % der früh erholten Patienten herzinsuffizient waren, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit des Auftretens von Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen oder CKD zwischen den beiden untersuchten Gruppen, sodass zwar das Risiko für das Auftreten einer AKI erhöht sein könnte, das frühe Outcome aber ggf. unabhängig von den Vorerkrankungen ist. In einer retrospektiven Studie untersuchten Bucaloiu et al. Einflussfaktoren auf die Mortalität und die Entwicklung einer CKD nach AKI [163]. Sie zeigten, dass Multimorbidität und ein höheres Alter mit unerwünschten Ereignissen assoziiert waren. An einer anderen Kohorte, bestehend aus 934 Patienten mit AKI, demonstrierten Lu et al., dass die Anzahl von Organdysfunktionen ein unabhängiger Risikofaktor für eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion ist [164]. Adipositas gilt ebenfalls als ein Risikofaktor für AKI, jedoch ist Übergewicht paradoxerweise oft mit einer geringeren Mortalität assoziiert [165]. Kim et. al untersuchten die Assoziation zwischen dem BMI und dem Mortalitätsrisiko bei 1144 koreanischen Patienten auf der Intensivstation [166]. Übergewichtige Patienten ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) hatten ein statistisch signifikant niedrigeres Mortalitätsrisiko als normalgewichtige Patienten (*hazard ratio* 0,81); die geringeren Mortalitätsraten bei Patienten mit Übergewicht und AKI waren jedoch nur bei besonders schweren Krankheitsverläufen zu beobachten [166]. In einer Arbeit von Druml et al. schien das Mortalitätsrisiko durch AKI bei übergewichtigen Patienten verringert [167]. In viele Studien bezüglich Übergewicht und AKI handelt es sich jedoch um retrospektive Studien, in denen viele Einflussfaktoren eventuell nicht mit einbezogen wurden. Kritische Krankheitsverläufe gehen oft mit ungewolltem Gewichtsverlust einher und könnten so den Einfluss des Gewichts auf die Mortalität beeinflussen [165]. Von den 71 beobachteten Patienten aus der vorliegenden Arbeit waren 28 % übergewichtig

(BMI > 30 kg/m²) ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten, die sich erholten und den Patienten ohne Erholung ($p = 0,966$). In der Gruppe ohne Erholung nach AKI litten 15 Patienten an Übergewicht, 8 dieser Patienten (53%) starben innerhalb des ersten Jahres nach AKI-Diagnosestellung.

Häufige Trigger für eine AKI sind die Sepsis, offene herzchirurgische Eingriffe und eine dekompensierte Herzinsuffizienz [4, 11, 12]. Auch in dem Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit sind die o.g. Ursachen häufig vertreten. Einen herzchirurgischen Eingriff erhielten 38 % der Patienten; eine AKI nach einem großen nicht-kardiochirurgischen Eingriff (darunter abdominelle Eingriffe und eine Thrombektomie bei einem Gefäßverschluss der Hand) entwickelten 23 % der Patienten. Eine Sepsis, oft als häufigste Ursache für eine AKI deklariert [12], war in dem vorliegenden Patientenkollektiv mit 21 % nur die dritthäufigste Ursache. Jedoch wurden die 71 Studienpatienten innerhalb eines Jahres auf der interdisziplinären operativen Intensivstation eingeschlossen, sodass Operationen als Ursache für eine AKI überrepräsentiert sein könnten im Vergleich zu einer internistischen Intensivstation.

a) Säure-Base-Haushalt und Elektrolyte

An allen 4 beobachteten Zeitpunkten (Tag 0, 1, 2 und 7 nach AKI) war das mediane Kalium in den BGAs in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI statistisch signifikant höher als in der Gruppe mit Erholung. Chen et. al zeigten, dass erhöhte Serum-Kaliumwerte sowie eine Hypo- und Hypernatriämie mit einer AKI-Progression sowie einer schlechteren Prognose assoziiert sind [168]. Oft sind die höhergradigen AKI-Stadien mit einer geringeren Urinausscheidung und somit auch mit einer Akkumulation von Kalium im Körper assoziiert. Am Tag der AKI-Diagnosestellung war das mediane Serum-Kalium in der BGA in beiden Gruppen in dieser Arbeit deutlich höher als am 7. Tag nach AKI-Diagnosestellung. Die Abnahme der Kalium-Level kann, vor allem in der Gruppe ohne Erholung nach AKI, auf die verwendeten Nierenersatzverfahren zurückgeführt werden, da ein Großteil der Patienten ohne Erholung innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI dialysepflichtig waren. Im Serum-Natrium konnte zu

keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

b) Parameter der Nierenfunktion

In einigen Studien galt der AKI-Schwergrad als prädiktiver Faktor für die Progression in eine CKD nach AKI [14, 161]. Macedo et al. konnten hingegen keine Assoziation zwischen dem AKI-Schweregrad und der Erholungsrate der Nierenfunktion feststellen [169]. Der Schweregrad der AKI war in beiden Gruppen in unserer Studie prozentual ähnlich vertreten. Bei den erholten Patienten hatten 61 % der Patienten eine AKI 2 und 39 % der Patienten eine AKI 3; bei den nicht erholten Patienten hatten 60 % der Patienten eine AKI 2 und 40 % eine AKI 3. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem Schweregrad einer AKI und einer potenziellen Erholung nach AKI festgestellt werden, jedoch wurden nur Patienten mit AKI-Schweregrad 2 oder 3 eingeschlossen. Demnach kann aus dieser Arbeit nicht darauf geschlossen werden, dass der Schweregrad nicht mit der Erholungsrate korreliert. Bei einem Vergleich von Patienten mit AKI 1 versus AKI 3 könnte eine Assoziation zwischen dem Schweregrad und der Erholungsrate vorliegen.

In einer Studie von Ali et al. war eine vorbestehende schlechte Nierenfunktion mit erhöhtem *Baseline*-SCr mit einer schlechteren Erholung der Nierenfunktion assoziiert [170]. Insgesamt 68 % der Patienten ohne Einschränkung der Nierenfunktion vor AKI-Diagnose erholten sich vollständig; in der Gruppe mit vorbestehender Nierenfunktionseinschränkung erholten sich nur 36 % der Patienten [170]. Ähnliche Ergebnisse konnten Macedo et al. in einer retrospektiven Studie darstellen; eine verminderte *Baseline*-Nierenfunktion war mit einer geringeren Erholungsrate 18 Monate nach AKI assoziiert [169]. Im Gegensatz dazu zeigten Ponte et al. in einer retrospektiven Studie, dass sich mehr Patienten mit AKI und einer bereits vorher eingeschränkten Nierenfunktion am Tag der Krankenhausentlassung erholt hatten, als Patienten mit normwertiger Nierenfunktion [171]. In unserer Studie gab es im *Baseline*-SCr zwischen den Patienten mit früher Erholung und den Patienten mit ausbleibender Erholung nach AKI keinen statistisch signifikanten Unterschied. Auch eine vorbestehende CKD in der Vorgeschichte war nicht mit einer geringeren oder erhöhten

Erholungsrate nach AKI assoziiert. Ein entscheidender Einflussfaktor auf diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte der Zeitpunkt der Festlegung der Erholung sein, da eine Erholung möglicherweise auch noch Monate nach AKI eintreten kann. Macedo et al. entschieden sich deswegen beispielsweise für eine Nachbeobachtung der Erholung 18 Monate nach der AKI-Episode, da einige Patienten auch nach 12 Monaten noch eine Verbesserung der Nierenfunktion im Sinne eines Anstiegs der GFR zeigten [169]. Neben der Verwendung des SCr für die Diagnosestellung der AKI und der Einschätzung der Erholung wird die AKI-Diagnose bei Verwendung KDIGO-Kriterien [4] auch anhand der ausgeschiedenen Urinmenge gestellt. Obwohl die ausgeschiedene Urinmenge als ein AKI-Diagnosekriterium gilt, haben sich bisher wenige Studien auf eine Oligurie als möglichen prädiktiven Faktor für eine AKI konzentriert [26]. In einer *Post-hoc*-Analyse einer prospektiven Beobachtungsstudie konnte gezeigt werden, dass die AUC der Urinausscheidung für die Vorhersage einer erfolgreiche Beendigung einer Nierenersatztherapie bei 0,85 lag; bei der Verwendung von Diuretika sank die AUC jedoch auf 0,67 [172]. Kellum et al. untersuchten das *Outcome* nach AKI bei Patienten, deren AKI-Diagnose entweder anhand des SCr, der ausgeschiedene Urinmenge oder anhand beider Kriterien zusammengestellt wurde [173]. Patienten mit einem erhöhten SCr und einer reduzierte Urinproduktion zum Zeitpunkt der AKI-Diagnosestellung, hatten ein schlechteres *Outcome* als die Patienten, die nur eines der beiden Kriterien erfüllten. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, auch die ausgeschiedene Urinmenge in Studien zur renalen Erholung miteinzubeziehen [173]. In unserer Studie war bei 15 % der Patienten sowohl das SCr erhöht als auch die Urinausscheidung erniedrigt, sodass anhand beider Parameter die AKI-Diagnosestellung erfolgte. Jedoch lag beim Vergleich der AKI-Diagnosestellung anhand beider Kriterien kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit früher Erholung und ausbleibender Erholung nach AKI vor. In unserer Studie war die ausgeschiedene Urinmenge innerhalb von 24 Stunden an den 4 beobachteten Zeitpunkten bei den erhaltenen Patienten signifikant höher als in der Gruppe mit ausbleibender Erholung. Dies könnte jedoch auf die Rate der RRT in beiden Gruppen zurückzuführen sein. An Tag 7 war kein Patient mit früher Erholung dialysepflichtig und während des gesamten Krankenhausaufenthaltes wurden nur 22 % der Patienten dieser Gruppe kurzfristig dialysiert. Von den Patienten

mit persistierendem Nierenschaden wurden 66 % der Patienten innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI-Diagnosestellung dialysiert. In der RENAL-Studie wurde gezeigt, dass höhere kumulative Flüssigkeitsbilanzen während der Nierenersatztherapie mit einer geringeren Erholung der Nierenfunktion assoziiert sind [66]. Gaiao et al. zeigten ebenfalls, dass eine positive Flüssigkeitsbilanz die Erholung nach AKI bei dialysepflichtigen Patienten vermindert [69]. Im Gegensatz dazu konnten Silversides et al. keine Assoziation zwischen der Flüssigkeitsbilanz während einer RRT und der Erholung der Nierenfunktion feststellen [174]. In unserer Kohorte bestand nur am Tag der AKI-Diagnosestellung ein signifikanter Unterschied in der Flüssigkeitsbilanz zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Die Patienten mit persistierendem Nierenschaden wurden an Tag 0 mit einer medianen Bilanz von 777 ml/24h deutlich positiv bilanziert, während die Patienten mit Erholung nach AKI mit einer medianen Bilanz von -59 ml/24h negativ bilanziert wurden. An allen anderen Tagen wurden beide Gruppen negativ bilanziert ohne statistisch signifikante Unterschiede. Dass es an den meisten Tagen keinen signifikanten Unterschied in der Flüssigkeitsbilanz zwischen den beiden Gruppen gibt, könnte ebenfalls mit der Anzahl der dialysepflichtigen Patienten zusammenhängen. In der Gruppe der Patienten mit persistierendem Nierenschaden erhielt ca. ein Drittel während des Krankenhausaufenthaltes eine RRT, mit der der Volumenhaushalt der Patienten gezielt gesteuert werden kann. Aufgrund dessen hatten diese Patienten vermutlich trotz geringerer Urinausscheidung eine ähnlich ausgeglichene Flüssigkeitsbilanz wie die Patienten ohne RRT, die eine erhaltene bzw. höhere Urinproduktion hatten.

c) Parameter einer Infektion und Sepsis

Sepsis ist ein häufiger Risikofaktor für die Entwicklung einer AKI und Patienten mit AKI erkranken häufiger an einer Sepsis [13, 21]. Patienten mit AKI und Sepsis haben eine erhöhte Mortalität im Vergleich mit Patienten mit einer Sepsis ohne AKI [175]. Einige infektiologische Parameter (Laktat, Leukozytenzahl und PCT) waren in unserer Studie an mehreren Zeitpunkten signifikant höher in der Gruppe der Patienten ohne Erholung nach AKI. Das CRP unterschied sich zwar zu keinem Zeitpunkt signifikant, dennoch lag das mittlere CRP in beiden Gruppen

an allen Zeitpunkten deutlich über dem Normwert von 0,5mg/dl. Die gemessenen Temperaturen unterschieden sich zu keinem der Zeitpunkte signifikant, jedoch waren 66 % der Patienten mit ausbleibender Erholung nach AKI dialysepflichtig. Eine klinisch häufig durchgeführte Kühlung mittels Dialyse bei Fieber könnte die Daten verzerren. Bagshaw et al. untersuchten das Outcome von 1753 Patienten mit septischer und nicht-septischer AKI [176]. Septische AKI war mit einer erhöhten Mortalitätsrate und einem längeren Krankenhausaufenthalt assoziiert, jedoch zeigten die septischen Patienten eine größere Erholungstendenz mit einer vermehrten Unabhängigkeit von Nierenersatzverfahren [176]. In unserem Patientenkollektiv erholten sich nur 3 von 15 Patienten (20 %) mit einer Sepsis innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI; 6 Patienten (40 %) starben bereits während des Krankenhausaufenthalts. Am Tag der Entlassung hatten sich insgesamt 5 Patienten erholt, an Tag 90 nach AKI galt ein weiterer Patient als erholt (insgesamt 40 % der Patienten mit septischer AKI). Somit lassen auch unsere Daten auf eine hohe Mortalitätsrate bei septisch induzierter AKI schließen, jedoch auch auf eine potenziell höhere Erholungsrate bei längerer Nachbeobachtung

d) GCS, APACHE-II- und SOFA-Score

Mehta et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen einem höheren APACHE II-Score und einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion sowie einer erhöhten Mortalitätsrate [177]. In einer multizentrischen prospektiven Beobachtungsstudie von Lin et al. war ein höherer SOFA-Score mit einer erhöhten 90-Tages-Mortalität assoziiert [178]. In der Kohorte der vorliegenden Arbeit hatten die Patienten ohne Erholung nach AKI an allen beobachteten Zeitpunkten einen signifikant höheren SOFA-Score und bei AKI-Diagnosestellung einen höheren APACHE-II-Score ($p = 0,007$). Uchino et al. testeten ebenfalls verschiedene Scores auf einen prädiktiven Nutzen für das Outcome nach AKI [179]. Weder der APACHE II-Score, der SOFA-Score sowie vier andere AKI-spezifische Scores hatten einen prädiktiven Vorhersagewert [179]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse und die möglicherweise unzureichende Einschätzung einer Nierenerholung anhand detaillierter Scores

macht deutlich, dass dringend geeignetere Biomarker mit besserem prädiktiven Wert gefunden werden müssen.

e) Stationärer Verlauf

Die Patienten ohne Erholung nach AKI in unserer Kohorte waren statistisch signifikant länger beatmet als die Patienten mit einer schnellen Erholung nach AKI ($p = 0,003$). Von den Patienten ohne Erholung nach AKI mussten 87 % beatmet werden, bei den Patienten mit Erholung nur 56 %. Malhotra et. al. entwickelten in einer multizentrischen Studie mit Patienten auf der Intensivstation einen Score, um eine AKI vorhersagen zu können [180]. Eine mechanische Ventilation stellte sich als unabhängiger prädiktiver Faktor für die Entstehung einer AKI heraus. Van den Akker et al. beschrieben in einer Metaanalyse verschiedener Studien, dass eine mechanische Ventilation mit einer dreifach erhöhten Wahrscheinlichkeit assoziiert ist, ein AKI zu entwickeln [181]. Wir konnten feststellen, dass an Tag 0, 2 und 7 nach AKI die Patienten mit ausbleibender Erholung eine höhere inspiratorische Sauerstoffkonzentration benötigten, als die Patienten mit früher Erholung. Am 7. Tag nach AKI lag bei den früh erholten Patienten die mediane FiO_2 -Konzentration bei 21 %, bei den Patienten ohne Erholung bei 40 % ($p = 0,003$). Nicht nur benötigten die erholten Patienten geringere Sauerstoffkonzentrationen, auch die Beatmungsdauer war bei den erholten Patienten statistisch signifikant kürzer ($p = 0,003$). Kellum et al. zeigten, dass eine schnelle Erholung nach AKI mit einem kürzeren Aufenthalt auf der Intensivstation sowie eine besseren 1-Jahres-Überlebensrate assoziiert ist [161]. Auch in unserer Kohorte war die Behandlungsdauer auf der Intensivstation bei Patienten mit einer frühen Erholung statistisch signifikant kürzer als bei den Patienten mit persistierender AKI ($p = 0,006$).

f) Nachbeobachtung

Bagshaw et al. beobachteten 240 kritisch kranke Patienten mit dialysepflichtiger AKI [21]. Insgesamt waren 32 % der Patienten am Tag der Krankenausentlassung weiterhin dialysepflichtig, nach einem Jahr wurden noch 22 % der Patienten regelmäßig dialysiert [21]. Kellum et al. untersuchten in einer Studie an 16968 kritisch kranken Patienten mit AKI-Stadien 2 und 3 die Erholung der Nierenfunktion, in der 26,6 % der Patienten einen frühen Rückgang des SCr

(innerhalb der ersten 7 Tage nach AKI) zeigten [161]. Als erholt galten die Patienten mit einem Rückgang der KDIGO-Kriterien[4] am Tag der Krankenhausentlassung. Insgesamt 22,5 % der Patienten durchlebten zwar während des Krankenhausaufenthaltes mehrere AKI-Episoden, hatten sich aber zum Zeitpunkt der Krankenhausentlassung erholt; 26,5 % der Patienten zeigten keinen Rückgang der AKI-Kriterien und erholten sich somit nicht [161]. Macedo et al. beobachteten 84 Patienten nach AKI, wovon sich 19 % der Patienten am Tag der Krankenhausentlassung und weitere 64 % der Patienten nach 18 Monaten erholt hatten [169]. In unserer Studie erholten sich 18 von 71 Patienten (25 %) innerhalb der ersten 7 Tage, die anderen 53 Patienten erholten sich nicht. Am Tag der Krankenhausentlassung und an Tag 90 nach AKI hatten sich insgesamt 34 Patienten (48 %) erholt, an Tag 365 galten insgesamt 37 % aller Patienten als erholt. Zwei Patienten entwickelten an Tag 90 und an Tag 365 erneute AKI-Episoden. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erholung nach AKI durch erneute AKI-Episoden gekennzeichnet sein kann und eine vollständige Erholung erst nach Wochen bis Monaten eintreten kann. Langzeitstudien weisen darauf hin, dass die Erholung der Nierenfunktion ein langwieriger Prozess sein könnte mit einem Maximum zwischen 90 Tagen und 6 Monaten [21, 182]. Kellum et al. konnten eine bessere 1-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einer frühen Erholung nach AKI zeigen [161]. In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass an allen beobachteten Zeitpunkten (am Tag der ICU- und der Krankenhausentlassung, an Tag 90 und an Tag 365) ein signifikanter Unterschied zwischen der Mortalitätsrate zwischen den untersuchten Gruppen bestand. An Tag 365 waren 55 % der Patienten mit persistierender AKI verstorben, während bei den früh erholten Patienten nur 17 % der Patienten in der beobachteten Zeit verstarben ($p = 0,005$). Die insgesamt hohe Mortalitätsrate von 45 % aller Patienten mit AKI in unserer Kohorte könnte verzerrt sein, da nur Patienten mit höhergradiger AKI (Stadium 2 und 3) eingeschlossen wurden und die Patienten multimorbide waren.

4.2.2 MiR-378a-3p, miR-194-5p, miR 34a-5p und miR-193a-5p als Biomarker der Erholung

In unserer Studie haben wir gezeigt, dass miRNAs als prädiktive Marker für eine ausbleibende Erholung nach AKI dienen können. An Tag 1 nach AKI waren die

vier untersuchten miRNAs (miR-378a-3p, miR-194-5p, miR-193a-5p und miR-34a-5p) im Plasma der Patienten ohne Erholung nach AKI signifikant hochreguliert. An Tag 7 nach AKI bestand in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der miRNA-Expression. MiRNAs könnten besonders in der Frühphase nach AKI als prognostische Parameter dienen. Aufgrund Ihrer Stabilität und des verlässlichen Nachweises mittels qRT-PCR gelten miRNAs als vielversprechende neue Biomarker.

a) *Biomarker der AKI*

Im letzten Jahrzehnt wurden viele urinaire und einige plasmatische Proteine als potenzielle neue Biomarker einer AKI untersucht. Bisher verwendete Biomarker wie das SCr und die GFR dienen keiner frühen Diagnosestellung und führen so zu einer Verzögerung einer zeitgerechten Intervention [69]. Eine frühzeitige Diagnosestellung kann die AKI-Prognose verbessern. Aufgrund dessen ist die Etablierung von Biomarkern mit einer besseren Sensitivität als das SCr für eine frühzeitige Intervention notwendig [183]. In den *KDIGO-Guidelines* wird empfohlen, Biomarker für die frühzeitige Diagnosestellung, Prognosemarker für AKI und eine chronische Schädigung sowie Prognosemarker für die Erholung nach AKI zu erforschen [4]. Die KDIGO-Definition der AKI anhand des SCr sowie der Urinausscheidung limitiert demnach möglicherweise die zeitgerechte und akkurate AKI-Diagnosestellung, sodass subklinische Nierendysfunktionen und Schädigungen übersehen werden könnten. Die GFR reflektiert erst spät die Veränderung der Nierenfunktion, da durch eine Hyperfiltration und Hypertrophie der gesunden Nephrons die Nierenfunktion lange aufrechterhalten werden kann [26].

Einige der neueren Biomarker erzielten in Studien zur frühzeitigen Diagnosestellung einer AKI gute Ergebnisse. Die AUC lag zur frühen AKI-Diagnosestellung einer CSA-AKI bei 0,65 für KIM-1 und bei 0,67 für NGAL [184]. Als Biomarker für eine AKI nach kardiochirurgischen Eingriffen lag die AUC bei 0,71 für CysC [185]. Bei der Verwendung des Produkts aus TIMP-2 und IGFBP-7 zur Prädiktion einer AKI in der SAPPHIRE-Studie ergab sich eine AUC von 0,8 [47]. Du et al. [186] zeigten in einer Studie an 120 Patienten nach kardiochirurgischem Eingriff, dass erhöhte Plasma- und Urinlevel von miR-21 mit

dem Schweregrad der AKI und einem schlechten Outcome assoziiert waren. Mit einer AUC von 0,8 war die Expression von miR-21 im Plasma der Patienten mit der Entwicklung einer AKI assoziiert [186]. In einer Studie von Ramachandran et al. konnten vier miRNAs zwischen Patienten mit und ohne AKI auf der Intensivstation differenzieren (miR-21, miR-200c, miR-423 und miR-4640) [187]. MiR-21, miR-200c und miR-423 waren im Urin von Patienten mit AKI hochreguliert, miR-4640 war vermindert exprimiert. Bei der Kombination dieser vier miRNAs konnte ein prädiktiver Nutzen der miRNAs mit einer AUC von 0,92 erreicht werden [187]. Aguado-Fraile et al. zeigten, dass miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-93-3p and miR-127-3p im Serum von Patienten herunterreguliert waren, die nach kardiochirurgischem Eingriff eine AKI entwickelten [73]. Eine Reihe von Studien fokussierten sich vor allem auf den Nachweis von Biomarkern zur frühen Diagnosestellung einer AKI. Zur Einschätzung der Erholung nach AKI ist die Datenlage bisher noch begrenzt und Studien bezüglich miRNAs als Marker für die Erholung der Nierenfunktion gibt es nach unserem Wissen bisher nur wenige [131].

Srisawat et al. untersuchten in einer *Post-hoc*-Analyse einer multizentrischen Studie NGAL und IL-6 als Marker zur Vorhersage einer Erholung der Nierenfunktion nach AKI bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie [70]. Plasmaproben wurden am Tag der RIFLE-F-Diagnosestellung gesammelt. Als erholt galten die überlebenden Patienten, die während des Krankenhausaufenthaltes keine RRT benötigten und bei der Entlassung keine persistierende RIFLE-F-Klassifikation erfüllten. In der Gruppe der erhaltenen Patienten war die mittlere NGAL-Konzentration im Plasma signifikant niedriger als in der Gruppe ohne Erholung ($p < 0.001$). Plasma-NGAL konnte bei den überlebenden Patienten mit einer AUC von 0,71 eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion vorhersagen [70]. Han et. al konnten mit der Kombination von NGAL, KIM-1 und NAG eine AUC von 0,78 zur Vorhersage einer postoperativen AKI erreichen [184]. Die Kombination von TIMP-2 und IGFBP-7 erzielte in einer anderen Studie bessere Ergebnisse in der AKI-Vorhersage mit einer AUC von 0,8 im Vergleich zu den beiden Markern allein (AUC = 0,79 bei TIMP-2 und AUC = 0,76 bei IGFBP-7) [47].

Aregger et al. untersuchten den Urin von 64 kritisch kranken Patienten auf potenzielle Biomarker zur Prädikation einer Nierenerholung [133]. IGFBP-7 und NGAL konnten zwischen Patienten mit früher Erholung (innerhalb von 7 Tagen) und später Erholung (nach 7 Tagen) diskriminieren. Eine signifikante Hochregulation der beiden Biomarker war mit einem schlechteren Outcome assoziiert. Eine vermehrte Expression von IGFBP-7 im Urin konnte mit einer AUC von 0,68 die Mortalität und mit einer AUC von 0,74 eine Erholung vorhersagen. Bei NGAL lag der prädiktive Nutzen bei einer AUC von 0,81 bei der Vorhersage der Mortalität und bei 0,70 bei der Erholung nach AKI [133].

Nach kardiochirurgischen Eingriffen untersuchten Meersch et al. Urinproben von 50 Patienten, von denen 26 Patienten postoperativ eine AKI entwickelten [49]. Das Produkt aus TIMP-2 und IGFBP-7 konnte als Biomarker für eine Erholung nach AKI dienen und ein Rückgang im Urin innerhalb der ersten 24h nach AKI konnte eine Erholung der Nierenfunktion mit einer AUC von 0,79 präzisieren [49]. In der RUBY-Studie wurden Biomarker identifiziert, die mit einer Persistenz eines schweren AKI (Stadium 3) von mehr als 72 Stunden assoziiert waren [71]. CCL 14 im Urin der Patienten mit AKI konnte ein persistierendes AKI Stadium 3 mit einer AUC von 0,83 am besten vorhersagen. Keiner der anderen untersuchten Marker, darunter KIM-1 im Urin, CysC im Plasma und NGAL im Urin, konnten eine AUC von mehr als 0,75 erreichen [71].

Einen Tag nach AKI-Diagnosestellung waren die miRNAs in unserer Studie im Plasma von Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion vermehrt exprimiert. Die miRNAs zeigten gute Ergebnisse der Performance zur Prädiktion einer ausbleibenden Erholung nach AKI mit einer AUC von 0,76 für miR378a-3p, von 0,77 für miR-194-5p, von 0,78 für miR-193a-5p und mit einer AUC von 0,80 für miR-34a-5p bei Patienten mit den AKI-Stadien 2 oder 3. Die miR-34a-5p war mit einer AUC von 0,80 der beste univariate prädiktive Wert für eine ausbleibende Erholung nach AKI (adjustierter p-Wert = 0,02). Eine Kombination von verschiedenen miRNAs zur Prädiktion einer Erholung nach AKI könnte die Performance der miRNAs als Prognosemarker noch verbessern, wie bereits bei der Kombination von TIMP-2 und IGFBP-7 gezeigt werden konnte [47].

b) *MiR-378a-3p, miR-194-5p, miR-34a-5p und miR-193a-5p*

Ding et al. konnten an Ratten zeigen, dass bei Ischämie-Reperfusionverletzungen (IRI) der Niere mit anschließender Ferroptose die miR-378a-3p überexprimiert ist [188]. Somit könnte die miR-378a-3p eine wichtige Rolle bei der Genexpression während der Ferroptose nach IRI spielen. Die Injektion eines Antagonisten von miR-378a-3p führte zu einem verminderten Anstieg des SCr bei Ratten sowie zu einer Verminderung des IRI-induzierten Untergangs von renalen Epithelzellen [188].

MiR-194-5p spielt bei der Entwicklung von Krebserkrankungen eine wichtige Rolle [189, 190]. Eine Herunterregulation von miR-194-5p, die vermehrt in Brustkrebszellen vorkommt, führte zu einer Inhibierung der Zellproliferation und Migration und hat somit Potential als Angriffspunkt der Brustkrebsprävention [191]. Beim Nephroblastom ist miR-194-5p im Tumorgewebe im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert exprimiert [192]. Nach einer Transfektion von miR-194-5p-Mimics in Nephroblastomzellen, die Zellmigration und Invasion reduziert werden [192].

MiR-34a-5p ist als Tumorsuppressor bereits gut erforscht bei Leberzell- [193] und kolorektalen Karzinomen [194] und ist zudem mit einer Alterung und verminderten Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten assoziiert [195]. Eine Inhibition von miR-34a-5p schützt Kardiomyozyten gegen hypoxisch bedingte Zellschädigung [196].

Auch miR-193a-5p spielt bei malignen Tumorerkrankungen eine große Rolle. Eine Hochregulation von miR-193a-5p unterstützt bei hepatozellulären Karzinomen das Wachstum von abnormalen Zellen [197]. Bei Ovarialkarzinomen induziert miR-193a-5p die Apoptose und reduziert die Zellproliferation [198].

Die bisherigen Studien zu den oben genannten miRNAs verdeutlichen, dass miRNAs in eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen involviert sind und somit in der Zukunft als wichtige diagnostische und therapeutische Angriffspunkte dienen könnten. Dieses ubiquitäre Vorkommen erschwert allerdings auch eine genaue Zuordnung von miRNAs zu einem bestimmten Krankheitsbild, da bei multimorbiden Patienten eine Vielzahl an miRNAs differentiell exprimiert sein könnten.

4.3 Ausblicke

In dieser Studie wurde an einem Zentrum bei 71 Patienten die Erholung nach AKI untersucht. Es wurden miRNAs identifiziert, die eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion zu einem frühen Zeitpunkt nach Entstehen der AKI anzeigen können. In einer nachfolgenden multizentrischen Studie soll anhand einer größeren Kohorte der prädiktive Nutzen von miRNAs bei der Erholung nach AKI weiter untersucht werden. Bisher wurden nur die Expressionsunterschiede der miRNAs im Plasma von Patienten untersucht. Weitere Analysen der miRNAs im Urin von Patienten mit AKI sollen folgen, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen anderen Biomarkern zu schaffen, die bisher nur im Urin bestimmt wurden. Der prädiktive Nutzen der miRNAs allein sowie in Kombination mit anderen vielversprechenden miRNAs soll weiter untersucht werden. Eine Kombination verschiedener miRNAs könnten den prädiktiven Nutzen erhöhen. Da die untersuchten miRNAs vor allem als frühe prädiktive Marker dienen könnten, sollen die Probenentnahmen in nachfolgenden Studien engmaschiger innerhalb der ersten 48h nach AKI erfolgen, um den Zeitpunkt mit dem besten prädiktiven Nutzen für eine Erholung nach AKI herauszufiltern. Für eine homogenere Studienpopulation könnten sich nachfolgende Studien auf Patienten mit gleichen AKI-Ursachen konzentrieren, beispielsweise ausschließlich auf Patienten mit AKI nach Sepsis oder CSA-AKI. Da eine miRNA viele verschiedene Prozesse und Gene beeinflussen kann, könnten sie in Zukunft nicht nur als diagnostische Marker, sondern möglicherweise auch als therapeutische Angriffspunkte dienen.

4.4 Schlussfolgerungen

Als häufiges Krankheitsbild spielt AKI bei kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation eine wichtige Rolle. Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, CKD, Mortalität und erhöhte Krankenhauskosten zeigen die Relevanz für eine Früherkennung einer AKI, die Etablierung von

Präventionsmaßnahmen sowie das Erkennen einer Erholung nach Nierenschädigung. Es wurde gezeigt, dass eine ausbleibende Erholung nach AKI mit verlängerten Krankenhausaufenthalten und einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert ist. Die Patienten ohne Erholung der Nierenfunktion nach AKI waren häufiger und länger dialysepflichtig, benötigten mehr Kreislaufunterstützung und wurden länger invasiv beatmet. Wir konnten zeigen, dass miR-378a-3p, miR-194-5p, miR-193a-5p und miR-34a-5p am ersten Tag nach AKI im Plasma der Patienten mit ausbleibender Erholung nach AKI vermehrt exprimiert waren. Am 7. Tag nach AKI bestand kein signifikanter Unterschied mehr in der Expression der miRNAs zwischen den beiden Gruppen. Die 4 ausgewählten miRNAs könnten demnach als frühe prädiktive Marker für eine ausbleibende Erholung der Nierenfunktion dienen und somit in Zukunft Therapieentscheidungen beeinflussen. Eine ausbleibende Erholung könnte zu einem früheren Beginn eines Nierenersatzverfahrens bewegen, mit einer eventuell frühzeitigeren Vermeidung von unerwünschten Ereignissen wie Volumenüberladung oder Elektrolytentgleisungen. Bei einer ausbleibenden Erholung, mit möglicherweise langwieriger intensivmedizinischer Betreuung, könnten betroffene Patienten frühzeitig in spezialisierte Zentren verlegt werden. Die Patienten mit einer prädizierten schnellen Erholung nach AKI könnten auf eine RRT mit potenziellen Komplikationen verzichten. Das frühzeitige Erkennen einer ausbleibenden Erholung der Nierenfunktion könnte einen schnelleren Beginn von Präventionsmaßnahmen sowie eine engmaschige Nachsorge zur Vermeidung einer CKD frühzeitig initiieren. Somit könnten miRNAs in Zukunft möglicherweise die Morbidität, die Mortalität und die Krankenhauskosten von Patienten mit einer AKI positiv beeinflussen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Meersch, M., S. Volmering, and A. Zarbock, *Prevention of acute kidney injury*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 361-370.
2. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. Crit Care, 2004. **8**(4): p. R204-12.
3. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
4. *Section 2: AKI Definition*. Kidney Int Suppl (2011), 2012. **2**(1): p. 19-36.
5. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(4): p. 241-257.
6. Ostermann, M. and K. Liu, *Pathophysiology of AKI*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 305-314.
7. Patel, S.S., et al., *Sequelae of AKI*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 415-425.
8. Bagshaw, S.M., et al., *A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(5): p. 1569-74.
9. Breighner, C.M. and K.B. Kashani, *Impact of e-alert systems on the care of patients with acute kidney injury*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 353-359.
10. Parr, S.K. and E.D. Siew, *Delayed Consequences of Acute Kidney Injury*. Adv Chronic Kidney Dis, 2016. **23**(3): p. 186-94.
11. Hoste, E.A., et al., *Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study*. Intensive Care Med, 2015. **41**(8): p. 1411-23.
12. Bellomo, R., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Acute kidney injury*. The Lancet, 2012. **380**(9843): p. 756-766.
13. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. JAMA, 2005. **294**(7): p. 813-8.
14. Chawla, L.S., et al., *The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease*. Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1361-9.
15. Mehta, R.L., et al., *Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience*. Kidney Int, 2004. **66**(4): p. 1613-21.
16. Hou, S.H., et al., *Hospital-acquired renal insufficiency: A prospective study*. The American Journal of Medicine, 1983. **74**(2): p. 243-248.
17. Clermont, G., et al., *Renal failure in the ICU: comparison of the impact of acute renal failure and end-stage renal disease on ICU outcomes*. Kidney Int, 2002. **62**(3): p. 986-96.
18. Poukkanen, M., et al., *Hemodynamic variables and progression of acute kidney injury in critically ill patients with severe sepsis: data from the prospective observational FINNAKI study*. Crit Care, 2013. **17**(6): p. R295.
19. Sun, L.Y., et al., *Association of intraoperative hypotension with acute kidney injury after elective noncardiac surgery*. Anesthesiology, 2015. **123**(3): p. 515-23.
20. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012. **2**(2): p. 1303-53.
21. Bagshaw, S.M., et al., *Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study*. Crit Care, 2005. **9**(6): p. R700-9.

22. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. N Engl J Med, 2014. **371**(1): p. 58-66.
23. Canaud, G. and J.V. Bonventre, *Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(4): p. 575-83.
24. Haase, M., J.A. Kellum, and C. Ronco, *Subclinical AKI--an emerging syndrome with important consequences*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(12): p. 735-9.
25. Waikar, S.S., R.A. Betensky, and J.V. Bonventre, *Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies?* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(11): p. 3263-5.
26. Goldstein, S.L., et al., *Renal recovery*. Crit Care, 2014. **18**(1): p. 301.
27. Teo, S.H. and Z.H. Endre, *Biomarkers in acute kidney injury (AKI)*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 331-344.
28. Brandenburger, T., et al., *Noncoding RNAs in acute kidney injury*. Kidney Int, 2018. **94**(5): p. 870-881.
29. Wetz, A.J., et al., *Quantification of urinary TIMP-2 and IGFBP-7: an adequate diagnostic test to predict acute kidney injury after cardiac surgery?* Crit Care, 2015. **19**: p. 3.
30. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. The Lancet, 2005. **365**(9466): p. 1231-1238.
31. Koyner, J.L., et al., *Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(5): p. 905-14.
32. Cardenas-Gonzalez, M., M. Pavkovic, and V.S. Vaidya, *Biomarkers of Acute Kidney Injury*, in *Comprehensive Toxicology*. 2018. p. 147-163.
33. Conti, M., et al., *Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction*. Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(3): p. 288-91.
34. Shlipak, M.G., et al., *Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons*. N Engl J Med, 2005. **352**(20): p. 2049-60.
35. Goetz, D.H., et al., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition*. Molecular Cell, 2002. **10**(5): p. 1033-1043.
36. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
37. Haase, M., et al., *The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(17): p. 1752-61.
38. Haase-Fielitz, A., et al., *The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(11): p. 3349-54.
39. Wagener, G., et al., *Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery*. Anesthesiology, 2006. **105**(3): p. 485-91.
40. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1657-68.
41. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4135-42.
42. Afshari, C.A., et al., *Identification of Putative Gene Based Markers of Renal Toxicity*. Environmental Health Perspectives, 2004.
43. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 237-44.

44. Liangos, O., et al., *Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(3): p. 904-12.
45. Bailly, V., et al., *Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39739-48.
46. Dieterle, F., et al., *Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 455-62.
47. Kashani, K., et al., *Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury*. Crit Care, 2013. **17**(1): p. R25.
48. Megyesi, J., R.L. Safirstein, and P.M. Price, *Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 777-82.
49. Meersch, M., et al., *Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93460.
50. *Section 5: Dialysis Interventions for Treatment of AKI*. Kidney Int Suppl (2011), 2012. **2**(1): p. 89-115.
51. Network, V.N.A.R.F.T., et al., *Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury*. N Engl J Med, 2008. **359**(1): p. 7-20.
52. Investigators, R.R.T.S., et al., *Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1627-38.
53. Investigators, S.-A., et al., *Timing of Initiation of Renal-Replacement Therapy in Acute Kidney Injury*. N Engl J Med, 2020. **383**(3): p. 240-251.
54. Barbar, S.D., et al., *Timing of Renal-Replacement Therapy in Patients with Acute Kidney Injury and Sepsis*. N Engl J Med, 2018. **379**(15): p. 1431-1442.
55. Gaudry, S., et al., *Timing of Renal Support and Outcome of Septic Shock and Acute Respiratory Distress Syndrome. A Post Hoc Analysis of the AKIKI Randomized Clinical Trial*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. **198**(1): p. 58-66.
56. Wald, R., et al., *Changing incidence and outcomes following dialysis-requiring acute kidney injury among critically ill adults: a population-based cohort study*. Am J Kidney Dis, 2015. **65**(6): p. 870-7.
57. Romagnoli, S., et al., *Renal replacement therapy for AKI: When? How much? When to stop?* Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 371-385.
58. *Section 3: Prevention and Treatment of AKI*. Kidney Int Suppl (2011), 2012. **2**(1): p. 37-68.
59. Moore, P.K., R.K. Hsu, and K.D. Liu, *Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018*. Am J Kidney Dis, 2018. **72**(1): p. 136-148.
60. Gocze, I., et al., *Biomarker-guided Intervention to Prevent Acute Kidney Injury After Major Surgery: The Prospective Randomized BigpAK Study*. Ann Surg, 2018. **267**(6): p. 1013-1020.
61. Forni, L.G., et al., *Renal recovery after acute kidney injury*. Intensive Care Med, 2017. **43**(6): p. 855-866.
62. Macedo, E. and R.L. Mehta, *Renal Recovery after Acute Kidney Injury*. Contrib Nephrol, 2016. **187**: p. 24-35.
63. Schetz, M., et al., *Recovery from AKI in the critically ill: potential confounders in the evaluation*. Intensive Care Med, 2015. **41**(9): p. 1648-57.
64. Prowle, J.R., et al., *Serum creatinine changes associated with critical illness and detection of persistent renal dysfunction after AKI*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(6): p. 1015-23.
65. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
66. Investigators, R.R.T.S., et al., *An observational study fluid balance and patient outcomes in the Randomized Evaluation of Normal vs. Augmented Level of Replacement Therapy trial*. Crit Care Med, 2012. **40**(6): p. 1753-60.

67. Billings, F.T.t. and A.D. Shaw, *Clinical trial endpoints in acute kidney injury*. Nephron Clin Pract, 2014. **127**(1-4): p. 89-93.
68. Kellum, J.A., *How can we define recovery after acute kidney injury? Considerations from epidemiology and clinical trial design*. Nephron Clin Pract, 2014. **127**(1-4): p. 81-8.
69. Gaiao, S.M. and J. Paiva, *Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury*. Rev Bras Ter Intensiva, 2017. **29**(3): p. 373-381.
70. Srisawat, N., et al., *Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts recovery from acute kidney injury following community-acquired pneumonia*. Kidney Int, 2011. **80**(5): p. 545-52.
71. Hoste, E., et al., *Identification and validation of biomarkers of persistent acute kidney injury: the RUBY study*. Intensive Care Med, 2020. **46**(5): p. 943-953.
72. Chen, C., et al., *Urinary miR-21 as a potential biomarker of hypertensive kidney injury and fibrosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17737.
73. Aguado-Fraile, E., et al., *A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127175.
74. Schena, F.P., G. Serino, and F. Sallustio, *MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(4): p. 755-63.
75. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
76. Liu, Z., et al., *Non-coding RNAs in kidney injury and repair*. Am J Physiol Cell Physiol, 2019. **317**(2): p. C177-C188.
77. Zhou, J., H. Chen, and Y. Fan, *Systematic analysis of the expression profile of non-coding RNAs involved in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice using RNA sequencing*. Oncotarget, 2017. **8**(59): p. 100196-100215.
78. Goretti, E., D.R. Wagner, and Y. Devaux, *miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine?* Trends Mol Med, 2014. **20**(12): p. 716-25.
79. Vencken, S.F., C.M. Greene, and P.J. McKiernan, *Non-coding RNA as lung disease biomarkers*. Thorax, 2015. **70**(5): p. 501-3.
80. Aguado-Fraile, E., et al., *MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury*. Nefrologia, 2013. **33**(6): p. 826-34.
81. Chang, J., et al., *miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1*. RNA Biol, 2004. **1**(2): p. 106-13.
82. Jenike, A.E. and M.K. Halushka, *miR-21: a non-specific biomarker of all maladies*. Biomark Res, 2021. **9**(1): p. 18.
83. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
84. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
85. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
86. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
87. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
88. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
89. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.

90. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
91. Metzinger-Le Meuth, V., et al., *The expanding roles of microRNAs in kidney pathophysiology*. Nephrol Dial Transplant, 2019. **34**(1): p. 7-15.
92. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
93. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.
94. Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, *miRBase: from microRNA sequences to function*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D155-D162.
95. Ulivi, P. and W. Zoli, *miRNAs as non-invasive biomarkers for lung cancer diagnosis*. Molecules, 2014. **19**(6): p. 8220-37.
96. Care, A., et al., *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 613-8.
97. Conserva, F., et al., *Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11357.
98. Gaede, L., et al., *Plasma microRNA-21 for the early prediction of acute kidney injury in patients undergoing major cardiac surgery*. Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(5): p. 760-6.
99. Bhatt, K., et al., *MicroRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival*. Mol Med, 2010. **16**(9-10): p. 409-16.
100. Lorenzen, J.M., et al., *Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(7): p. 1540-6.
101. Borges, N.M., et al., *Angiomirs expression profiling in diffuse large B-Cell lymphoma*. Oncotarget, 2016. **7**(4): p. 4806-16.
102. Popov, T.M., et al., *Proangiogenic signature in advanced laryngeal carcinoma after microRNA expression profiling*. Mol Biol Rep, 2020. **47**(7): p. 5651-5655.
103. Gilad, S., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3148.
104. McDonald, J.S., et al., *Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges*. Clin Chem, 2011. **57**(6): p. 833-40.
105. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
106. Mraz, M., et al., *MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(1): p. 1-4.
107. Wei, Q., Q.S. Mi, and Z. Dong, *The regulation and function of microRNAs in kidney diseases*. IUBMB Life, 2013. **65**(7): p. 602-14.
108. Putta, S., et al., *Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(3): p. 458-69.
109. Obad, S., et al., *Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 371-8.
110. Yheskel, M. and V. Patel, *Therapeutic microRNAs in polycystic kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2017. **26**(4): p. 282-289.
111. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. N Engl J Med, 2013. **368**(18): p. 1685-94.
112. Brandenburger, T. and J.M. Lorenzen, *Diagnostic and Therapeutic Potential of microRNAs in Acute Kidney Injury*. Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 657.
113. Teasdale, G. and B. Jennett, *Assessment of Coma and Impaired Consciousness*. The Lancet, 1974. **304**(7872): p. 81-84.
114. Vincent, J.L., et al., *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-10.

115. Knaus, W.A., et al., *APACHE II: a severity of disease classification system*. Crit Care Med, 1985. **13**(10): p. 818-29.
116. Behjati, S. and P.S. Tarpey, *What is next generation sequencing?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2013. **98**(6): p. 236-8.
117. van Dijk, E.L., et al., *Ten years of next-generation sequencing technology*. Trends Genet, 2014. **30**(9): p. 418-26.
118. Wagner, G.P., K. Kin, and V.J. Lynch, *Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples*. Theory Biosci, 2012. **131**(4): p. 281-5.
119. Robinson, M.D. and A. Oshlack, *A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data*. Genome Biol, 2010. **11**(3): p. R25.
120. Dillies, M.A., et al., *A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis*. Brief Bioinform, 2013. **14**(6): p. 671-83.
121. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
122. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D605-D612.
123. Dalmer, T.R.A. and R.D. Clugston, *Gene ontology enrichment analysis of congenital diaphragmatic hernia-associated genes*. Pediatr Res, 2019. **85**(1): p. 13-19.
124. Gene Ontology, C., *Gene Ontology Consortium: going forward*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D1049-56.
125. Supek, F., et al., *REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21800.
126. Thornton, B. and C. Basu, *Rapid and simple method of qPCR primer design*. Methods Mol Biol, 2015. **1275**: p. 173-9.
127. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
128. Hoo, Z.H., J. Candlish, and D. Teare, *What is an ROC curve?* Emerg Med J, 2017. **34**(6): p. 357-359.
129. Hoste, E.A.J. and W. Vandenberghe, *Epidemiology of cardiac surgery-associated acute kidney injury*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2017. **31**(3): p. 299-303.
130. Bellomo, R., et al., *Acute kidney injury in sepsis*. Intensive Care Med, 2017. **43**(6): p. 816-828.
131. Newbury, L.J., et al., *miR-141 mediates recovery from acute kidney injury*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 16499.
132. Sonoda, H., et al., *miRNA profiling of urinary exosomes to assess the progression of acute kidney injury*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4692.
133. Aregger, F., et al., *Identification of IGFBP-7 by urinary proteomics as a novel prognostic marker in early acute kidney injury*. Kidney Int, 2014. **85**(4): p. 909-19.
134. Bernardi, M.H., et al., *Serum Creatinine Back-Estimation in Cardiac Surgery Patients: Misclassification of AKI Using Existing Formulae and a Data-Driven Model*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(3): p. 395-404.
135. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med, 1999. **130**(6): p. 461-70.
136. Pickering, J.W. and Z.H. Endre, *Back-calculating baseline creatinine with MDRD misclassifies acute kidney injury in the intensive care unit*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(7): p. 1165-73.

137. Wehbe, E., et al., *Recovery from AKI and short- and long-term outcomes after lung transplantation*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(1): p. 19-25.
138. Yang, F., et al., *Clinical analysis of cause, treatment and prognosis in acute kidney injury patients*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e85214.
139. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
140. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
141. Margulies, M., et al., *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 376-80.
142. Valouev, A., et al., *A high-resolution, nucleosome position map of C. elegans reveals a lack of universal sequence-dictated positioning*. Genome Res, 2008. **18**(7): p. 1051-63.
143. Ju, J., et al., *Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19635-40.
144. Liu, L., et al., *Comparison of next-generation sequencing systems*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 251364.
145. Lang, J., et al., *Evaluation of the MGISEQ-2000 Sequencing Platform for Illumina Target Capture Sequencing Libraries*. Front Genet, 2021. **12**: p. 730519.
146. Xuan, J., et al., *Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges*. Cancer Lett, 2013. **340**(2): p. 284-95.
147. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
148. Schulte, J.H., et al., *Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(17): p. 5919-28.
149. Ugras, S., et al., *Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5659-69.
150. Persson, H., et al., *Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene*. Cancer Res, 2011. **71**(1): p. 78-86.
151. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
152. Taylor, S.C., et al., *The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time*. Trends Biotechnol, 2019. **37**(7): p. 761-774.
153. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. RNA, 2008. **14**(5): p. 844-52.
154. Wang, Y., et al., *Quantification of distinct let-7 microRNA family members by a modified stem-loop RT-qPCR*. Mol Med Rep, 2018. **17**(3): p. 3690-3696.
155. Forero, D.A., et al., *qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs*. Biotechniques, 2019. **67**(4): p. 192-199.
156. Bernardo, B.C., et al., *miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart*. Future Med Chem, 2015. **7**(13): p. 1771-92.
157. Wu, M., et al., *MiRNA-based Therapeutics for Lung Cancer*. Curr Pharm Des, 2018. **23**(39): p. 5989-5996.
158. Redshaw, N., et al., *A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability*. Biotechniques, 2013. **54**(3): p. 155-64.

159. Schmitt, R. and L.G. Cantley, *The impact of aging on kidney repair*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(6): p. F1265-72.
160. Xu, X., et al., *Epidemiology and Clinical Correlates of AKI in Chinese Hospitalized Adults*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(9): p. 1510-8.
161. Kellum, J.A., et al., *Recovery after Acute Kidney Injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(6): p. 784-791.
162. Srisawat, N., et al., *Urinary biomarkers and renal recovery in critically ill patients with renal support*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(8): p. 1815-23.
163. Bucaloiu, I.D., et al., *Increased risk of death and de novo chronic kidney disease following reversible acute kidney injury*. Kidney Int, 2012. **81**(5): p. 477-85.
164. Lu, R., et al., *Survey of acute kidney injury and related risk factors of mortality in hospitalized patients in a third-level urban hospital of Shanghai*. Blood Purif, 2014. **38**(2): p. 140-8.
165. Schiffl, H., *Obesity and the Survival of Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury: A Paradox within the Paradox?* Kidney Dis (Basel), 2020. **6**(1): p. 13-21.
166. Kim, H., et al., *The impact of disease severity on paradoxical association between body mass index and mortality in patients with acute kidney injury undergoing continuous renal replacement therapy*. BMC Nephrol, 2018. **19**(1): p. 32.
167. Druml, W., et al., *Impact of body mass on incidence and prognosis of acute kidney injury requiring renal replacement therapy*. Intensive Care Med, 2010. **36**(7): p. 1221-8.
168. Chen, D.N., et al., *Relationship between early serum sodium and potassium levels and AKI severity and prognosis in oliguric AKI patients*. Int Urol Nephrol, 2021.
169. Macedo, E., D.M. Zanetta, and R.C. Abdulkader, *Long-term follow-up of patients after acute kidney injury: patterns of renal functional recovery*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36388.
170. Ali, T., et al., *Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1292-8.
171. Ponte, B., et al., *Long-term functional evolution after an acute kidney injury: a 10-year study*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(12): p. 3859-66.
172. Uchino, S., et al., *Discontinuation of continuous renal replacement therapy: a post hoc analysis of a prospective multicenter observational study*. Crit Care Med, 2009. **37**(9): p. 2576-82.
173. Kellum, J.A., et al., *Classifying AKI by Urine Output versus Serum Creatinine Level*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(9): p. 2231-8.
174. Silversides, J.A., et al., *Fluid balance, intradialytic hypotension, and outcomes in critically ill patients undergoing renal replacement therapy: a cohort study*. Crit Care, 2014. **18**(6): p. 624.
175. Godin, M., P. Murray, and R.L. Mehta, *Clinical approach to the patient with AKI and sepsis*. Semin Nephrol, 2015. **35**(1): p. 12-22.
176. Bagshaw, S.M., et al., *Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes*. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(3): p. 431-9.
177. Mehta, R.L., et al., *A randomized clinical trial of continuous versus intermittent dialysis for acute renal failure*. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 1154-63.
178. Lin, Y.F., et al., *The 90-day mortality and the subsequent renal recovery in critically ill surgical patients requiring acute renal replacement therapy*. Am J Surg, 2009. **198**(3): p. 325-32.
179. Uchino, S., et al., *External validation of severity scoring systems for acute renal failure using a multinational database*. Crit Care Med, 2005. **33**(9): p. 1961-7.
180. Malhotra, R., et al., *A risk prediction score for acute kidney injury in the intensive care unit*. Nephrol Dial Transplant, 2017. **32**(5): p. 814-822.

181. van den Akker, J.P., M. Egal, and A.B. Groeneveld, *Invasive mechanical ventilation as a risk factor for acute kidney injury in the critically ill: a systematic review and meta-analysis*. Crit Care, 2013. **17**(3): p. R98.
182. Liano, F., et al., *Long-term outcome of acute tubular necrosis: a contribution to its natural history*. Kidney Int, 2007. **71**(7): p. 679-86.
183. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 5-14.
184. Han, W.K., et al., *Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(5): p. 873-82.
185. Koyner, J.L., et al., *Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery*. Kidney Int, 2008. **74**(8): p. 1059-69.
186. Du, J., et al., *MicroRNA-21 and risk of severe acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63390.
187. Ramachandran, K., et al., *Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury*. Clin Chem, 2013. **59**(12): p. 1742-52.
188. Ding, C., et al., *miR-182-5p and miR-378a-3p regulate ferroptosis in I/R-induced renal injury*. Cell Death Dis, 2020. **11**(10): p. 929.
189. Wang, Y., et al., *A novel lncRNA MCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 28.
190. Wang, Y., et al., *MiR-194-5p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer by targeting E2F3*. J BUON, 2018. **23**(5): p. 1492-1499.
191. Yang, F., Z. Xiao, and S. Zhang, *Knockdown of miR-194-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer by regulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Int J Mol Med, 2018. **42**(6): p. 3355-3363.
192. Liu, H., et al., *MiR-194-5p inhibited metastasis and EMT of nephroblastoma cells through targeting Crk*. Kaohsiung J Med Sci, 2020. **36**(4): p. 265-273.
193. Xu, X.P., et al., *miR-34a-5p suppresses the invasion and metastasis of liver cancer by targeting the transcription factor YY1 to mediate MYCT1 upregulation*. Acta Histochem, 2020. **122**(6): p. 151576.
194. Hasakova, K., et al., *Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and correlates with survival and clock gene PER2 expression*. PLoS One, 2019. **14**(10): p. e0224396.
195. Boon, R.A., et al., *MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function*. Nature, 2013. **495**(7439): p. 107-10.
196. Shi, K., et al., *miR-34a-5p aggravates hypoxia-induced apoptosis by targeting ZEB1 in cardiomyocytes*. Biol Chem, 2019. **400**(2): p. 227-236.
197. Wang, J.T. and Z.H. Wang, *Role of miR-193a-5p in the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(21): p. 7233-7239.
198. Wang, S., Y.J. Diao, and B.B. Zhu, *MiR-193a-5p suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by regulating HOXA7 in human ovarian cancer*. Neoplasma, 2020. **67**(4): p. 825-833.

Danksagungen

Ich möchte mich zuerst bei PD Dr. med. Timo Brandenburger bedanken, für seine großartigen Ideen, seine Geduld, seine Unterstützung und seine konstruktive Kritik während des gesamten Promotionsverfahrens. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Detlef Kindgen-Milles bedanken, für die Möglichkeit, auf der interdisziplinären operativen Intensivstation Patienten zu rekrutieren und, unterstützt von seiner Arbeitsgruppe, einen ersten Einblick in die Wissenschaft zu erhalten.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, darunter Dr. Thomas Dimski, Laura Huthmann, Daniela Kaierle sowie Claudia Dohle. Ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zu einer sehr interessanten und lehrreichen Zeit beigetragen.

Michael, ich danke dir für deine Unterstützung, deine Kritik und deinen Humor. Danke, dass du an meiner Seite bist.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern Karlheinz und Marlene. Eure bedingungslose Liebe, euer Vertrauen und eure Unterstützung sind ein Geschenk.