

Aus der Klinik für Anästhesiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Untersuchung der microRNAs miR-1, miR-16-5p und miR-122-5p als Marker einer akuten Nierenschädigung nach herzchirurgischem Eingriff

Dissertation

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

vorgelegt von

Daniela Margarita Lourenço Kaierle

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Timo Brandenburger

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Zusammenfassung

Jede Form von akut auftretender Einschränkung der Nierenfunktion wird unabhängig von ihrem Ausprägungsgrad als akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*, AKI) bezeichnet. Sie ist eine der häufigsten Erkrankungen auf Intensivstationen und mit einem hohen Mortalitätsrisiko verbunden. Kardiochirurgische Eingriffe stellen nach der Sepsis den zweitgrößten Risikofaktor für eine postoperativ entwickelte AKI dar. Zur Diagnostik der AKI werden bisher Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion verwendet, die unspezifisch sind, von äußeren Einflüssen abhängen und eine Nierenschädigung nur verzögert anzeigen. In den letzten Jahren sind zunehmend nichtkodierende, sogenannte Mikroribonukleinsäuren (engl. *miRNAs*) in den Forschungsfokus gerückt. Sie regulieren die Genexpression posttranskriptionell durch Inhibierung der Proteintranslation, wodurch sie Einfluss auf eine Vielzahl von biologischen Prozessen nehmen. In die MiRAKI-Studie (*MicroRNAs in Acute Kidney Injury*) wurden 148 kardiochirurgische Patienten eingeschlossen und jeweils Blut- und Urinproben vor der Operation, postoperativ bei Ankunft auf der Intensivstation (t_0), sowie 24 (t_{24}) und 72 Stunden (t_{72}) nach Ankunft abgenommen. Die Patienten wurden postoperativ nach KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) in drei Gruppen eingeteilt: Stadium 0 (keine AKI), Stadium 1 (leichte AKI) und Stadium 2 & 3 (höher- und hochgradige AKI). Zunächst wurde eine differentielle Expressionsanalyse durch NGS (engl. *Next Generation Sequencing*) der miRNAs im Blut von 6 Patienten ohne AKI und 6 Patienten mit AKI Stadium 2 & 3 durchgeführt. Anhand dessen wurden die miRNAs miR-1, -16-5p und -122-5p identifiziert und für Validierungsversuche ausgewählt. Mittels microRNA-spezifischer quantitativer Echtzeit-PCR wurde der Gehalt dieser drei miRNAs in den Plasmaproben der Patienten zu den o.g. drei postoperativen Zeitpunkten bestimmt, um zu untersuchen, ob sie als potenzielle AKI-Marker in Frage kommen. Außerdem wurde das AKI-Risiko in der MiRAKI-Studie mittels eines bereits etablierten Urintests zur Risikoeinschätzung für AKI ermittelt (TIMP-2 x IGFBP7) sowie relevante klinische und laborchemische Daten erfasst.

In der MiRAKI-Studie zeigte die Expressionsdynamik der miRNAs beim Vergleich von Patienten mit und ohne AKI sehr unterschiedliche Verläufe in den ersten drei postoperativen Tagen. MiR-122-5p war als einzige miRNA bereits an t_0 bei allen AKI-Patienten gegenüber Patienten ohne AKI erhöht exprimiert. An t_{24} war das Expressionsniveau bei Patienten mit AKI 2 & 3 signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen ($p = 0,004$). Die Bestimmung von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin an t_0 zeigte in Übereinstimmung mit anderen Studien signifikant höhere Werte bei Patienten mit AKI 2 & 3 (AUC 0,82). Verschiedene Risikotests (u.a. der SOFA-Score) erzielten signifikant höhere Werte bei AKI-Patienten, die zudem eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen. Die Expressionserhöhung von miRNAs im Kontext von AKI sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Summary (English Version)

Any form of acute reduced kidney function, regardless of its severity, is called acute kidney injury or acute kidney impairment (AKI). It is one of the most common conditions in intensive care units (ICU) and associated with a high risk of mortality. Cardiac surgery is the second most common risk factor for postoperative AKI, right after sepsis. To date, parameters to assess renal function have been used for diagnosis, however, these markers are nonspecific, dependent on external influences, and can only indicate renal damage with a delay. In recent years, research has increasingly focused on non-coding microribonucleic acids (miRNAs). They regulate gene expression post-transcriptionally by inhibiting protein translation, thereby influencing a variety of biological processes.

The MiRAKI study (MicroRNAs in Acute Kidney Injury) included 148 cardiac surgery patients and blood and urine samples were collected before surgery, postoperatively upon arrival at ICU (t_0), 24 (t_{24}) and 72 hours (t_{72}) after arrival, respectively. Patients were divided into three groups postoperatively according to KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes): stage 0 (no AKI), stage 1 (mild AKI), and stages 2 & 3 (high-grade AKI). First, differential expression analysis by NGS (Next Generation Sequencing) of miRNAs was performed in the blood of 6 patients without AKI and 6 patients with stage 2 & 3 AKI. Based on this, miRNAs miR-1, -16-5p and -122-5p were identified and selected for further validation. MicroRNA-specific quantitative real-time PCR was used to determine the levels of these three miRNAs in plasma samples at the above mentioned three postoperative time points to investigate whether they could be potential AKI markers. Furthermore, AKI risk was determined in the MiRAKI study using an already established urine test for AKI risk assessment (TIMP-2 x IGFBP7) as well as relevant clinical and laboratory data were collected.

Relative expression dynamics of the three miRNAs analyzed in the MiRAKI study showed very different patterns in the first three postoperative days when comparing patients with and without AKI. MiR-22-5p was the only upregulated miRNA at t_0 in all AKI patients compared to healthy controls. At t_{24} , the expression level was significantly higher in patients with AKI 2 & 3 compared to patients without AKI ($p = 0.004$). Determination of urinary TIMP-2 x IGFBP7 at t_0 showed significantly higher levels in patients with AKI 2 & 3 (AUC 0.82), in accordance to several other studies. Various risk tests (including the SOFA score) scored significantly higher in AKI patients, who also had a significantly higher mortality rate. The increased expression of miRNAs in the context of AKI should be the subject of future studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AaDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz
AF	Atemfrequenz
AKI	<i>Acute kidney injury/impairment</i> (akute Nierenschädigung)
AKI 0	Keine Nierenschädigung nach KDIGO-Kriterien
AKI 1	„Leichte“ Nierenschädigung
AKI 2 & 3	„Höhergradige“ Nierenschädigung
AKIN	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATN	Akute tubuläre Nekrose
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BE	<i>Base Excess</i> (Basenabweichung)
BMI	Body-Mass-Index
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C. elegans/ Cel	Caenorhabditis elegans
Ca ²⁺	Calcium
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Grafting</i> (Koronararterienbypass)
Cel-miR-39	C. elegans-microRNA-39
CNV	Chronisches Nierenversagen
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
Cq/Ct	<i>Quantification cycle/ threshold cycle</i> (Beginn der exponentiellen Vermehrung des untersuchten Fragments in der PCR)
CRF	<i>Case report form</i> (pseudonymisierte Datentabelle)
CRP	C-reaktives Protein
CSA-AKI	<i>Cardiac surgery associated acute kidney injury</i> (mit kardiochirurgischen Operationen assoziierte AKI)
Cystatin C	Cystein-Proteinase
d.h.	Das heißt
DGfN	Deutsche Gesellschaft für Nephrologie
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
ECC	<i>Extracorporeal circulation</i> (Dauer der Nutzung der HLM)
ECLS	<i>Extracorporeal Life Support</i> (extrakorporale Lebensunterstützung)
ECMO	<i>Extracorporeal membrane oxygenation</i> (extrakorporale Membranoxygenierung)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EF	Ejektionsfraktion
engl.	Englisch
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel)

FDR	<i>False Discovery Rate</i> (Falscherkennungsrate)
FiO₂	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
G	Guanin
GFR eGFR	Glomeruläre Filtrationsrate Geschätzte (<i>estimated</i>) glomeruläre Filtrationsrate
GFR-Cyst	GFR-Berechnung nach der CKD-EPI-Cystatin-C-Formel
HES	Hydroxyethylstärke
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HRS	Hepatorenales Syndroms
hsa	Homo sapiens
HWI	Harnwegsinfektion
IABP	Intraaortale Ballonpumpe
ICU	Intensive Care Unit (Intensivstation)
IGFBP7	Insulin like growth factor-binding protein 7
IgG	Immunglobulin G
intraop	Intraoperativ
k.A.	Keine Angabe
K⁺	Kalium
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
KIM-1	Kidney injury molecule 1
Leukos	Leukozyten
L-FABP	Liver-type fatty acid-binding protein
logCPM	Logarithmische Counts Pro Millionen Reads
logFC	Logarithmischer Fold Change
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MIC	Minimalinvasive Chirurgie (an einer Herzklappe)
MIDCAB	<i>Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass</i> (minimalinvasiver Koronararterienbypass)
mind.	Mindestens
miQPCR	MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR
MiRAKI	MicroRNAs in Acute Kidney Injury (Studienname)
miRNA/ microRNA pri-miRNA pre-miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> (Mikroribonukleinsäure) Primärtranskript-miRNA <i>Precursor</i> (Vorläufer-) miRNA
MKE/R	Mitralklappenersatz/ -rekonstruktion
MM	Mastermix
mRNA	Messenger (Boten-) RNA
Na⁺	Natrium
NAST	Nierenarterienstenose
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NGS	Next Generation Sequencing

NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
o.g.	Oben genannte/n/r/s
Osmol	Osmolalität
OP	Operation
OPCAB	<i>Off-Pump-Coronary-Artery-Bypass</i> (Koronararterienbypass ohne HLM)
OR	Odd's Ratio
paO₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
qPCR	<i>Quantitative real time PCR</i> (quantitative Echtzeit-PCR)
PCT	Procalcitonin
postop.	Postoperativ
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i> (Durchführung einer leichten Ischämie eines Organs mit anschließender Reperfusion)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (Komplex aus miRNA und Proteinen)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase(n)	Ribonuklease(n)
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> (Operationscharakteristik eines Beobachters)
RVAD	<i>Right Ventricular Assist Device</i> (rechtsventrikuläres Unterstützungssystem)
s. / s.o. / s.u.	Siehe / siehe oben / siehe unten
SaO₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i> (Score zur Beurteilung des Organversagens bei Sepsis)
sog.	Sogenannte/r/s
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i> (ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt)
STS	Society of Thoracic Surgeons
SvO₂	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung
T	Thymin
t_{prä}	Präoperativ kurz vor der Operation
t₀	Bei Ankunft auf der Intensivstation
t₂₄	24 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation
t₇₂	72 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation
T1/2/3	Tailing Mix 1/2/3
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
TKE/R	Trikuspidalklappenersatz/ -rekonstruktion
T_m	<i>Melting temperature</i> (Schmelzpunkt, bei dem 50% einer doppelsträngigen DNA als denaturierter Einzelstrang vorliegt)
TMM	Trimmed mean of M-values (Normalisierungsmethode)
U	Uracil
u.a.	Unter anderem/n
Z.n.	Zustand nach
3'-UTR	Untranslated region (untranslatierte Region einer mRNA)

Abkürzungsverzeichnis der Einheiten:

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
dl	Deziliter
fmol	Femtomol
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
Mosm	Milliosmol
ng	Nanogramm
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Sek.	Sekunde(n)
U	<i>Units</i> (Einheiten)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Akute Nierenschädigung (AKI)	1
1.1.1	Definition und Schweregrade.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	2
1.1.3	Diagnostik.....	4
1.1.4	Neue Biomarker für AKI.....	5
1.2	MicroRNAs.....	6
1.2.1	Definition und Synthese von microRNAs	6
1.2.2	MicroRNAs bei verschiedenen Pathologien	8
1.2.3	MicroRNAs bei AKI.....	8
1.3	Fragestellung.....	9
2	Methodik.....	10
2.1	Studiendesign.....	10
2.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	11
2.1.2	Probenentnahme	12
2.1.3	Case Report Form (CRF)	13
2.2	Next Generation Sequencing (NGS).....	14
2.3	Isolierung der miRNAs.....	15
2.4	MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR	16
2.4.1	cDNA-Synthese.....	17
2.4.2	Primer-Design.....	19
2.4.3	Echtzeitquantifizierung	19
2.5	TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI	22
2.6	Methoden der Datenverarbeitung.....	22
2.6.1	World Wide Web tools.....	22
2.6.2	Statistische Auswertung.....	23
2.7	Material.....	23
2.7.1	Reagenzien	23
2.7.2	Geräte und Materialien für Probenaufbewahrung.....	24
2.7.3	Software	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Inzidenz von AKI in der MiRAKI-Studie.....	26
3.2	Next Generation Sequencing (NGS)	26

3.3	MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (miQPCR)	27
3.4	TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI	31
3.5	Nierenfunktionsparameter, Diurese und Volumenbalance	32
3.6	Hämodialyse	36
3.7	Patientencharakteristika	37
3.7.1	Geschlecht, Größe, Alter und Gewicht	37
3.7.2	Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen	38
3.7.3	Präoperative Merkmale	39
3.8	Art und Dauer der Operation	40
3.9	Laborchemische Parameter	42
3.9.1	Infektionsparameter	42
3.9.2	Leberwerte	44
3.9.3	Elektrolyte	45
3.9.4	Beatmung	47
3.10	Überlebenswahrscheinlichkeit und Mortalität	49
3.11	Entlassungsmerkmale	50
4	Diskussion	52
4.1	Methodik	52
4.1.1	Studiendesign	52
4.1.2	Echtzeitquantifizierung	53
4.2	Ergebnisse	57
4.2.1	MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (miQPCR)	57
4.2.2	TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI	60
4.2.3	Nierenfunktionsparameter, Diurese und Volumenbalance	62
4.2.4	Hämodialyse	64
4.2.5	Patientencharakteristika	64
4.2.6	Art und Dauer der Operation	65
4.2.7	Laborchemische Parameter	66
4.2.8	Überlebenswahrscheinlichkeit und Mortalität	70
4.2.9	Entlassungsmerkmale	72
5	Schlussfolgerung	73
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	75
7	Danksagung	82

1 Einleitung

1.1 Akute Nierenschädigung (AKI)

1.1.1 Definition und Schweregrade

In der englischsprachigen Leitlinie von *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) 2012 wird der Begriff *Acute Kidney Injury* oder *Acute Kidney Impairment* (AKI) verwendet, um akute Veränderungen der Nierenfunktion und jegliche akut auftretende Funktionsstörung oder Schädigung der Nieren zu bezeichnen [1]. Zuvor hatten unterschiedliche diagnostische Kriterien und klinische Definitionen einer akuten Nierenschädigung zu einer Vielzahl von uneinheitlichen Definitionen geführt.

Nach KDIGO [2] ist eine AKI definitionsgemäß

- ein Anstieg des Serumkreatinins um mindestens 0,3 mg/dl innerhalb von 48 Stunden, oder
- ein Anstieg des Serumkreatinins auf das 1,5- bis 1,9-Fache des Ausgangswertes, von dem bekannt ist oder vermutet wird, dass er innerhalb der letzten 7 Tage aufgetreten ist, oder
- eine eingeschränkte Urinausscheidung unter 0,5 ml/kgKG/h für mindestens 6 Stunden.

AKI wird nach KDIGO [2] in drei Schweregrade unterteilt (s. Tabelle 1):

Grad	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dl (26,5 $\mu\text{mol/l}$) <i>oder</i> Anstieg auf das 1,5- bis 1,9-Fache des Ausgangswerts	$< 0,5$ ml/kg KG/h für 6–12 h
2	Anstieg auf das 2,0- bis 2,9-Fache des Ausgangswerts	$< 0,5$ ml/kg KG/h für ≥ 12 h
3	Anstieg auf das $\geq 3,0$ -Fache des Ausgangswerts <i>oder</i> Anstieg auf $\geq 4,0$ mg/dl (353,6 $\mu\text{mol/l}$) <i>oder</i> Beginn einer Nierenersatztherapie <i>oder</i> Abnahme der eGFR auf < 35 ml/min/1,73 m ² bei Patienten unter 18 Jahren	$< 0,3$ ml/kg KG/h für ≥ 24 h <i>oder</i> Anurie für ≥ 12 h

Tabelle 1: Schweregrade der AKI nach Kidney Disease Improving Global Outcomes [2]

AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung), KG: Körpergewicht, eGFR: geschätzte glomeruläre Filtrationsrate.

1.1.2 Epidemiologie

AKI ist eine häufig auftretende Erkrankung, die unter anderem als Komplikation bei kritisch kranken Patienten¹ oder nach durchgeführten medizinischen Eingriffen auftritt. Sie führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität, sowie weiteren Komplikationen wie kardiovaskulären Erkrankungen, chronischer bis hin zu terminaler Niereninsuffizienz und damit auch zu einer enormen ökonomischen Belastung. Die weltweite Prävalenz wird mit einer Spanne von < 1 % bis 66 % angegeben [3]. Diese Spanne kann zum einen durch den ökonomischen Status verschiedener Länder (und die damit in unterschiedlichem Ausmaß durchgeführte Diagnostik) und zum anderen durch die in der Vergangenheit uneinheitlich genutzte Definition von AKI erklärt werden. Für die Entstehung von AKI sind patientenbezogene Faktoren (wie Alter, Geschlecht, Herkunft, Komorbiditäten und dauerhafte Medikamenteneinnahme) und andere beeinflussende Faktoren (wie septischer oder kardiogener Schock, nephrotoxische Medikamente und Organdysfunktion) ursächlich [3]. Die Inzidenz der AKI wird in manchen Studien laut Hoste et al. zu hoch eingeschätzt, wenn bspw. ein unentdecktes chronisches Nierenversagen (CNV) fälschlicherweise als AKI eingestuft wird, und zu niedrig, wenn Patienten mit subklinischer, also noch nicht detektierbarer Nierenerkrankung, nicht erkannt werden [3]. Von AKI häufig betroffene Kohorten sind hospitalisierte Patienten, kritisch kranke Patienten, kardiochirurgisch operierte Patienten und Sepsispatienten [3].

Herzchirurgische Eingriffe sind nach dem septischen Schock die zweit häufigste Ursache, die mit der Entwicklung einer AKI assoziiert sind [4]. Diese sog. mit kardiochirurgischen Operationen assoziierte AKI (*cardiac surgery associated acute kidney injury, CSA-AKI*) geht mit erhöhter Morbidität und Mortalität, sowie einer längeren Verweildauer im Krankenhaus einher [5]. Jährlich werden weltweit nahezu zwei Millionen kardiochirurgische Operationen durchgeführt [6]. Die Inzidenz von AKI nach kardiochirurgischer Operation wird mit 3,1 % bis 42 % angegeben, was auf die Art der durchgeführten Operation und Unterschiede in den Ausgangsmerkmalen der Patienten zurückzuführen ist [7]. Die Pathophysiologie von AKI nach herzchirurgischen Eingriffen ist nach wie vor unvollständig verstanden und vermutlich auf mehrere Ursachen zurückzuführen: dazu zählen Hypoperfusion, Ischämie-Reperfusionverletzungen des Nierengewebes, neurohumorale Aktivierung, Entzündung, oxidativer Stress, Nephrotoxine und mechanische Faktoren [7].

¹ Das in dieser Dissertation aus Gründen der besseren Lesbarkeit gewählte generische Maskulinum (bspw. „Patienten“) bezieht sich immer zugleich auf weibliche und männliche Personen (bspw. „Patienten und Patientinnen“).

Da man AKI nicht ursächlich therapieren kann, liegt der klinisch-praktische Fokus vor allem auf der Prävention, indem man prä-, intra- und postoperativ besondere Strategien einhält. Die Leitlinie von KDIGO [2] empfiehlt ein stufenweises Management abhängig vom AKI-Risiko und -Schweregrad. Dazu zählen unabhängig vom Schweregrad das Absetzen von nephrotoxischen Medikamenten und Vermeiden von Kontrastmittelgaben, den Volumenstatus und Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten, funktionelles hämodynamisches Monitoring zu verwenden, Serumkreatinin und Urinausscheidungsmenge zu überwachen und Hyperglykämien zu vermeiden. Stufenweise kommen nicht-invasive und invasive diagnostische Abklärung, Überprüfung von Dosierungsänderungen bei Medikamentengaben, Nierenersatzverfahren und intensivmedizinische Überwachung hinzu.

Thiele et al. [8] beschreiben für herzchirurgische Patienten folgende präventive Strategien: Blutzuckerkontrollen, regionalanästhesiologische Verfahren, Immunmodulation durch Steroide, zielgerichtete Therapien bezüglich Herzzeitvolumen und Flüssigkeitsreaktionsfähigkeit des Herzens (z.B. Anstieg des Herzindex nach Volumengabe), sowie Kontrollen der Sauerstoffversorgungsindices (z. B. zentralvenöse Sauerstoffsättigung, SvO₂) durchzuführen. Es wird auch die postoperative präventive Hämodialyse vorgeschlagen, sowie Apparaturen zum Abfangen der gelösten Plaques während der Herzoperation oder sogenanntes *Remote Ischemic Preconditioning* (RIPC, ein Verfahren, bei dem eine leichte Ischämie eines Organs mit anschließender Reperfusion durchgeführt wird, mit dem Ziel ein anderes Organ, wie das Herz, vor einer nachfolgenden Episode von Ischämie und Reperfusion zu schützen). Versuche mit Stammzellen haben in Tiermodellen ebenfalls die Auswirkungen von AKI verbessert. Die Vermeidung bestimmter Medikamente spielt auch hier eine wichtige Rolle. Zu den nephrotoxischen Medikamenten zählen u.a. diverse Antibiotika, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), und Kontrastmittel.

In der Versorgung von Patienten sollten, sofern möglich, AKI-Risikofaktoren vermieden werden. Patientenbezogene Risikofaktoren sind Volumenmangel, Alter, weibliches Geschlecht, CNV, chronische Herz-, Leber-, oder Lungenerkrankungen, Diabetes mellitus, Karzinome und genetische Faktoren. Zu expositionsbezogenen Faktoren zählen Sepsis, kardiochirurgische oder anderweitig große operative Eingriffe, Kreislaufchock, kritische Erkrankungen, Verbrennungen, schwere Traumata, nephrotoxische Medikamente und Kontrastmittelgabe [9].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AKI bei hospitalisierten Patienten auf unterschiedlichen Ursachen beruht, in verschiedenen Schweregraden ausgeprägt sein kann und das Risiko für ein unerwünschtes Behandlungsergebnis erhöht. In Anbetracht der großen Zahl an betroffenen Patienten ist es dringend notwendig, eine verbesserte Prävention und Behandlung von AKI in der allgemeinen Krankenhausversorgung zu schaffen [3].

1.1.3 Diagnostik

Aktueller Standard zur Diagnostik einer AKI sind die Untersuchung der Konzentration des Kreatinins und Harnstoffs im Serum, sowie die Menge der Urinausscheidung. Dies sind Marker der Nierenfunktion, jedoch nicht der Nierenschädigung. Sie sind unspezifisch und ändern sich nur verzögert [9, 10]. Ein Anstieg des Serumkreatinins tritt nach einer Operation am Herzen bspw. erst 48 Stunden nach der Intervention auf [5].

Das **Serumkreatinin** ist an einer Vielzahl von intra- und extrarenalen Funktionen beteiligt und stellt ein in den Muskeln gebildetes Stoffwechselprodukt dar, das ungebunden im Blut zirkuliert und von den Glomeruli der Nieren frei filtriert wird [11, 12]. Die Konzentration ist von vielfältigen Prozessen abhängig, bspw. von der Muskelmasse [13]. Bei Erhöhung kann man jedoch nicht zwischen struktureller Nierenschädigung und funktionalen hämodynamischen Ursachen unterscheiden [10]. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zur Einschätzung der Nierenfunktion kann durch verschiedene, auf dem Serumkreatinin basierenden Formeln errechnet werden. Das Serumkreatinin steigt allerdings erst an, wenn etwa 50 % der Nephrone ihre Funktion verloren haben [14] und die GFR bereits erheblich reduziert ist ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, sog. Kreatininblinder Bereich) [15]. Daher ist die Erkennung einer Nierenverschlechterung bei Personen mit annähernd normaler Nierenfunktion (d.h. $GFR \geq 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) eingeschränkt.

Harnstoff entsteht in der Leber als Stoffwechselprodukt von stickstoffhaltigen Substanzen und wird über die Nieren ausgeschieden [16]. Eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut deutet auf eine verminderte GFR hin, wohingegen eine Erniedrigung auf eine Leberfunktionsstörung weisen kann [17]. Die Harnstoffkonzentration im Blut hängt u.a. von der Stickstoffzufuhr mit der Nahrung, der Leberfunktion und dem Wasserhaushalt ab und sollte daher nur im Zusammenhang mit anderen Nierenfunktionsmarkern interpretiert werden [17].

Die **Urinausscheidung** (Diurese) ist nicht nur abhängig von der Nierenfunktion, sondern auch von verschiedenen anderen Einflüssen, wie zum Beispiel einem vorhandenen Volumenmangel oder einer medikamentösen Therapie mit Diuretika [9].

Cystatin C ist ein Protein aus der Familie der Cystein-Proteinase-Inhibitoren, das kontinuierlich und in relativ konstanter Rate von kernhaltigen Zellen produziert wird [12, 18]. Es wird frei von den Glomeruli der Nieren filtriert und komplett ins Tubulussystem rückresorbiert ohne ausgeschieden zu werden [18]. Die Konzentration im Serum ist daher abhängig von der GFR. Es ist dem Serumkreatinin als Biomarker für die Erkennung von AKI überlegen [18]. Nur bei Nierentubulus-Dysfunktion ist es im Urin zu finden, unabhängig von der GFR [19]. Cystatin C im Urin zeigte sich bei herzchirurgischen Patienten zur Frühdiagnose einer AKI gegenüber herkömmlichen Plasmamarkern überlegen [20].

Seit einigen Jahren läuft die Suche nach neuen, spezifischen und von äußeren Einflüssen unabhängigen Biomarkern. Ein optimaler Biomarker sollte möglichst nicht-invasiv messbar sein, früh im Krankheitsverlauf detektierbar, prognostisch relevant, sowie spezifisch für die untersuchte Erkrankung und von pathophysiologischer Bedeutung sein [21]. Bei der AKI sollten außerdem der Schweregrad der Erkrankung und die Auswirkung von Interventionen auf die Erholung der Nierenfunktion mitevaluiert werden können [10].

1.1.4 Neue Biomarker für AKI

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden einige neue potenzielle Biomarker für AKI gefunden, die im Blut oder Urin messbar sind. Zu ihnen gehören *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), *kidney injury molecule 1* (KIM-1), *liver-type fatty acid-binding protein* (L-FABP), *tissue inhibitor of metalloproteinase 2* (TIMP-2) und *insulin like growth factor-binding protein 7* (IGFBP7).

NGAL ist ein bakteriostatisch wirkendes Protein, das eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielt, indem es die Eisenaufnahme durch Bakterien begrenzt [22]. Es steigt nach ischämischer oder toxischer Nierenschädigung innerhalb von wenigen Stunden im Urin an [23, 24]. Die Konzentration von NGAL ist bei gesunden Individuen nicht erhöht [25]. Die NGAL-Spiegel im Plasma steigen schnell und proportional zur Schwere und Dauer der Schädigung an [24, 25]. Eine erhöhte NGAL-Expression erhöht auch bei unauffälligem Cystatin C das Risiko für Mortalität, Einsatz von Nierenersatzverfahren und Krankenhausaufenthaltsdauer [23].

KIM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein mit extrazellulärer Immunglobulin-ähnlicher Domäne [26]. Es wird bei einer Nierenschädigung nach Ischämie oder medikamenteninduzierter AKI signifikant hochreguliert [26, 27]. Studien an Erwachsenen haben gezeigt, dass KIM-1 im Urin als Biomarker für einen proximalen Tubulusschaden der Niere dienen könnte [28] und dass eine Erhöhung im Urin mit vermehrter Dialysepflicht und Sterblichkeit assoziiert ist [29]. Han et al. zeigten, dass KIM-1 im Urin nach kardiopulmonalem Bypass bei Patienten mit AKI deutlich erhöht war im Vergleich mit Patienten ohne AKI [30]. Da KIM-1 für den Nachweis von Nephrotoxizität nützlich zu sein scheint, wurde es von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) als AKI-Biomarker für die präklinische Arzneimittelentwicklung anerkannt [31].

L-FABP gehört zur Familie von Trägerproteinen für Fettsäuren und hilft bei der Regulierung der Fettsäureaufnahme und des intrazellulären Transports [32]. Höhere L-FABP-Spiegel im Urin stehen in Zusammenhang mit erhöhter Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens und erhöhter Mortalität [33]. Zeng et al. beschrieben die Kombination von NGAL und L-FABP im Urin als vielversprechend für die Erkennung von AKI bei Patienten, die sich einer größeren Operation unterziehen [34]. Bei pädiatrischen Patienten erwies sich L-FABP im Urin als ein empfindlicher

früher Biomarker für AKI nach kardiopulmonalen Bypass-Operationen [35]. Somit scheint L-FABP im Urin ein vielversprechender Biomarker für Diagnose und Vorhersage von AKI bei kritisch kranken Patienten zu sein [36].

Die Proteine **TIMP-2** und **IGFBP7** wirken inhibitorisch auf Signalkaskaden und werden als Reaktion auf DNA-Schäden, die durch ischämische oder entzündliche Ereignisse verursacht werden, in den Nierentubulus-Zellen vermehrt exprimiert [37]. Sie sind in der Frühphase einer ischämischen oder septischen Nierenschädigung am G₁ Zellzyklusarrest der Nierenepithelzellen beteiligt [38]. Kashani et al. analysierten mehr als 300 Biomarker in zwei multizentrischen Observationsstudien und identifizierten das Produkt aus beiden Proteinen (TIMP-2 x IGFBP7) als wichtigen Biomarker zur Vorhersage von AKI [38]. Diese Kombination zeigte sich vielen anderen bisher beschriebenen Biomarkern (wie Cystatin C, NGAL und KIM-1) bei der Prädiktion von AKI überlegen. Bell et al. zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin von Diabetikern zu finden ist [39]. Die Messung der Konzentration von TIMP-2 und IGFBP7 im Urin kann als Risikoeinschätzungstest für AKI bereits klinisch genutzt werden (s. Kapitel 2.5).

Für viele Erkrankungen gibt es bereits spezifische Biomarker, die zur Diagnostik und zum Teil auch zur Einschätzung des Verlaufs einer Erkrankung dienen. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das kardiale Troponin als Marker für eine akute myokardiale Ischämie. Solch ein spezifischer Marker existiert bisher nicht zur Diagnostik von AKI. Zunehmend rücken sogenannte Mikroribonukleinsäuren (engl. *micro ribonucleic acid*, microRNA, miRNA) in den Forschungsfokus.

1.2 MicroRNAs

1.2.1 Definition und Synthese von microRNAs

MicroRNAs sind endogene, nichtkodierende, 19-24 nukleotidlange RNA-Moleküle, die die Genexpression posttranskriptionell regulieren, indem sie die Proteintranslation inhibieren oder den mRNA-Abbau fördern [40]. Der Großteil der miRNAs kommt intrazellulär vor, ein beachtlicher Teil wird jedoch auch in verschiedene Körperflüssigkeiten sezerniert und ist deswegen bspw. im Blut und Urin nachweisbar [41]. Die sezernierten miRNAs scheinen in gewisser Weise verpackt zu sein, da sie nicht durch Ribonukleasen (RNasen), die sich in den meisten Körperflüssigkeiten befinden, verdaut werden [40]. MicroRNAs sind ein vielversprechender neuer Biomarker zur Diagnostik und möglicherweise auch zur Therapie verschiedenster Erkrankungen, da sie in diesen Körperflüssigkeiten stabil vorkommen, einfacher zu detektieren sind als Plasmaproteine, zum Teil in bestimmten Geweben angereichert vorkommen (z.B. miR-122 in der Leber und miR-1 im

Herzen) und durch spezifische Antagonisten oder *Mimics* (Imitatoren) beeinflusst werden können [9].

Im Jahr 1993 wurde die erste miRNA namens *lin-4* im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) gefunden [42]. Laut der Datenbank *miRBase* wurden bis heute im Menschen knapp 2000 miRNAs identifiziert [43] und repräsentieren damit 1% der menschlichen Gene [44]. Zunächst synthetisiert die RNA Polymerase II die Primärtranskripte (*pri-miRNAs*), die durch das Enzym *Drosha-DGCR8* in doppelsträngige *pre-miRNAs* gespalten werden [45]. Schließlich transportiert *Exportin 5* die prä-miRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo sie durch die Ribonuclease *Dicer* in etwa 22 Nukleotid lange doppelsträngige RNA-Fragmente (reife miRNAs) geteilt werden [46]. Um ihre Funktion auszuüben, wird ein einzelner Strang, meist der Leitstrang, zusammen mit anderen Proteinen in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut [9]. Der RISC ist in der Lage mRNA (messenger RNA) an ihrem nicht translatierten Bereich (3'-UTR, *untranslated region*) zu binden und damit zur Inhibierung der Proteintranslation oder zum Abbau jener mRNA zu führen [47]. Der Syntheseprozess ist in Abb. 1 dargestellt.

Man geht davon aus, dass jede miRNA im Durchschnitt mehr als 100 mRNAs bindet, sodass mehr als 60% aller mRNAs des Menschen durch miRNAs reguliert werden [48, 49].

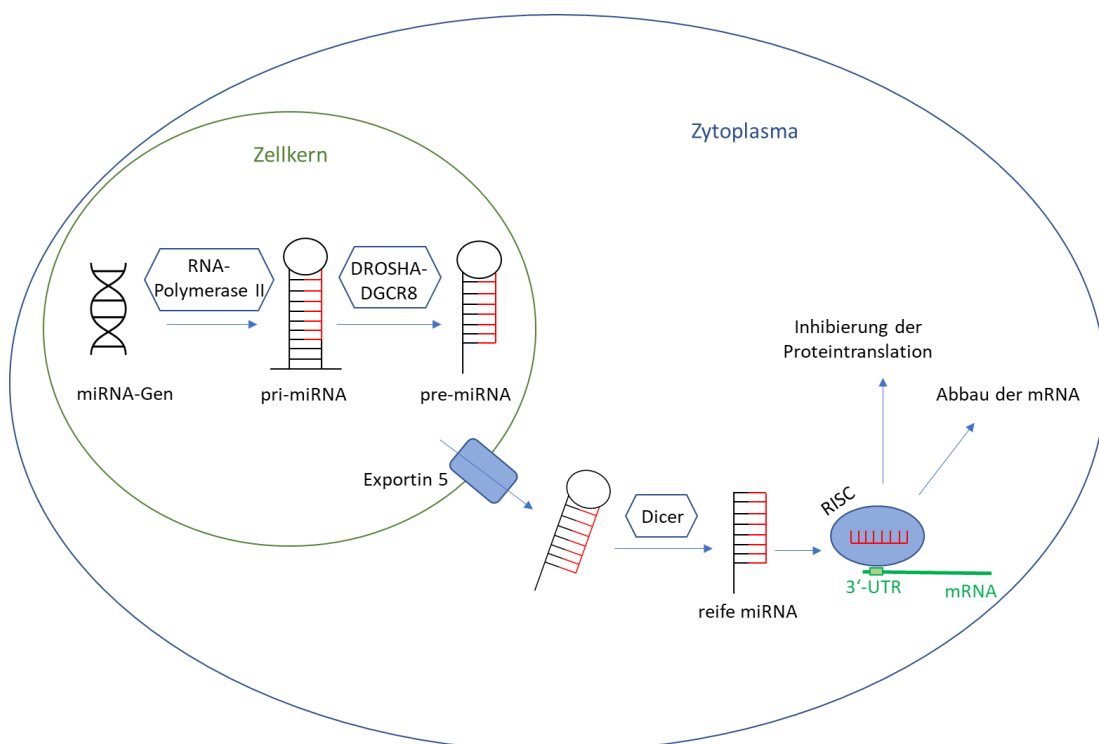


Abb. 1: Syntheseprozess der miRNAs nach Aguado-Fraile [50]

miRNA: micro ribonucleic acid (Mikroribonukleinsäure), *pri-miRNA*: Primärtranskript-miRNA, *pre-miRNA*: precursor (Vorläufer-) miRNA, *RISC*: RNA-induced silencing complex, *3'-UTR*: untranslated Region einer mRNA, *mRNA*: messenger (Boten-) Ribonukleinsäure.

1.2.2 MicroRNAs bei verschiedenen Pathologien

Wie man zahlreichen wissenschaftlichen Artikeln entnehmen kann, kommen nichtkodierende RNAs reichlich und in verschiedensten Zellen und Geweben vor. Sie spielen dabei eine wichtige Rolle im Erhalt der Homöostase und Zellfunktion. Aufgrund der Regulation von Transkription und Translation von proteinkodierenden Genen scheinen sie direkt oder indirekt zur Verhinderung, Entstehung und Progression von Krankheiten beizutragen [51]. Die Rolle von miRNAs bei der Entstehung von Herz-, Lungen-, Skelettmuskulatur- und Tumorerkrankungen ist bereits gut dokumentiert [51].

1.2.3 MicroRNAs bei AKI

MicroRNAs wurden bereits in zahlreichen Tierstudien und ebenso am Menschen im Zusammenhang mit AKI untersucht. Wichtige Studien der letzten Jahre über die Erforschung von miRNAs bei AKI wurden 2018 von Brandenburger et al. [9] zusammengefasst. Im Folgenden wird zunächst auf wesentliche Studien über miRNAs bei AKI im Tiermodell und schließlich beim Menschen eingegangen.

Eine der ersten Studien, die sich mit miRNAs bei AKI befasste, wurde 2010 von Wei et al. veröffentlicht [52]. Diese Arbeitsgruppe entwickelte ein Mausmodell, bei dem in den proximalen Tubuluszellen ein Schlüsselenzym für die miRNA-Produktion fehlte. Diese Mäuse wiesen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern eine deutlich bessere Nierenfunktion und weniger Gewebeschäden auf nach ischämischer Nierenschädigung.

Seitdem wurde in verschiedenen Tiermodellen eine signifikante Hoch- und Herunterregulierung von miRNAs bei AKI nachgewiesen. Eine der am häufigsten analysierten miRNAs im Zusammenhang mit AKI ist miR-21. Sie beeinflusst Apoptose, Entzündung und Fibrose von Nierenzellen und scheint daher bei dysregulierter Expression auch an der Pathogenese von AKI beteiligt zu sein [9, 53]. Lee et al. [54] identifizierten 2014 zwei miRNAs, die an der Regulation von medikamentös induzierter Nierenschädigung von Mäusen beteiligt zu sein scheinen: miR-122 wird dabei vermindert und miR-34a vermehrt exprimiert. Die 2014 publizierten Ergebnisse von Lorenzen et al. [55] deuten darauf hin, dass miR-24 die ischämische Nierenschädigung in Mäusen fördert, indem die Apoptose von Nierenepithelzellen stimuliert wird. Chen et al. [56] zeigten 2016 an Mäusen, bei denen eine ischämische Nierenschädigung durchgeführt wurde, dass miR-16 früher nachweisbar ist als Kreatinin. Eine Überexpression von miR-16 ruft zudem eine Nierenfunktionsstörung hervor, was zu einem erhöhten Nachweis von miR-16 im Urin führt.

Lorenzen et al. [57] führten 2011 eine der ersten Studien über die Erforschung von miRNAs im Kontext von AKI am Menschen durch, wobei sich miR-210 als unabhängiger und starker

Mortalitäts-Prädiktor in Patienten mit AKI gegenüber Patienten ohne AKI erwies. In der gleichen Studie war dabei die Expression von miR-16 and miR-320 in Patienten mit AKI herunterreguliert. In einer Studie von Aguado-Fraile et al. [58] wurde gezeigt, dass verschiedene miRNAs (insbesondere präoperativ bestimmte miR-26b-5p, -27a-3p, -93-3p und -127-3p) eine AKI bei herzchirurgischen Patienten zuverlässig vorhersagen konnten. In einer ähnlichen Studie zeigten Gaede et al. [59], dass der präoperative Ausgangswert von miR-21 bei Patienten, die nach herzchirurgischem Eingriff eine AKI entwickelten, deutlich niedriger war als bei Patienten ohne AKI.

1.3 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob miRNAs potenzielle Marker für AKI bei kardiochirurgischen Patienten sein können. Dabei werden Veränderungen im Gehalt (Expressions-Veränderungen) von miR-1, -16-5p und -122-5p bei Patienten mit und ohne AKI verglichen und die postoperative Dynamik analysiert.

2 Methodik

2.1 Studiendesign

An der MiRAKI-Studie nahmen von den 155 eingeschlossenen Patienten 148 teil. Sieben Patienten wurden ausgeschlossen: zwei starben vor t_0 , einer starb vor t_{24} , einer erhielt einen interventionellen Eingriff anstelle einer Herzoperation, einer erhielt ein Kunstherz, einer hatte eine HIV-Infektion und bei einem erfolgte keine präoperative Blutabnahme.

Es folgten Urin- und Blut-Abnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten und die pseudonymisierte Erfassung von klinischen Daten. Anhand der Urinproben wurden sowohl laborchemische Daten ermittelt, als auch ein Risikoeinschätzungstest für AKI (Messung von TIMP-2 x IGFBP7) durchgeführt. Anhand der Blutproben wurden ebenfalls laborchemische Daten ermittelt, so wie eine Sequenzierung aller vorhandenen miRNAs in 12 ausgewählten Proben (NGS) – zur Ermittlung der zu untersuchenden miRNAs – und die Isolierung von miRNAs aus allen Patientenproben durchgeführt. Auf die Isolierung der miRNAs folgte eine microRNA-spezifische Echtzeitquantifizierung (PCR) und schließlich die statistische Auswertung aller klinischen, laborchemischen und PCR-Daten. Einen orientierenden Überblick über Aufbau und Ablauf der Studie bietet Abb. 2.

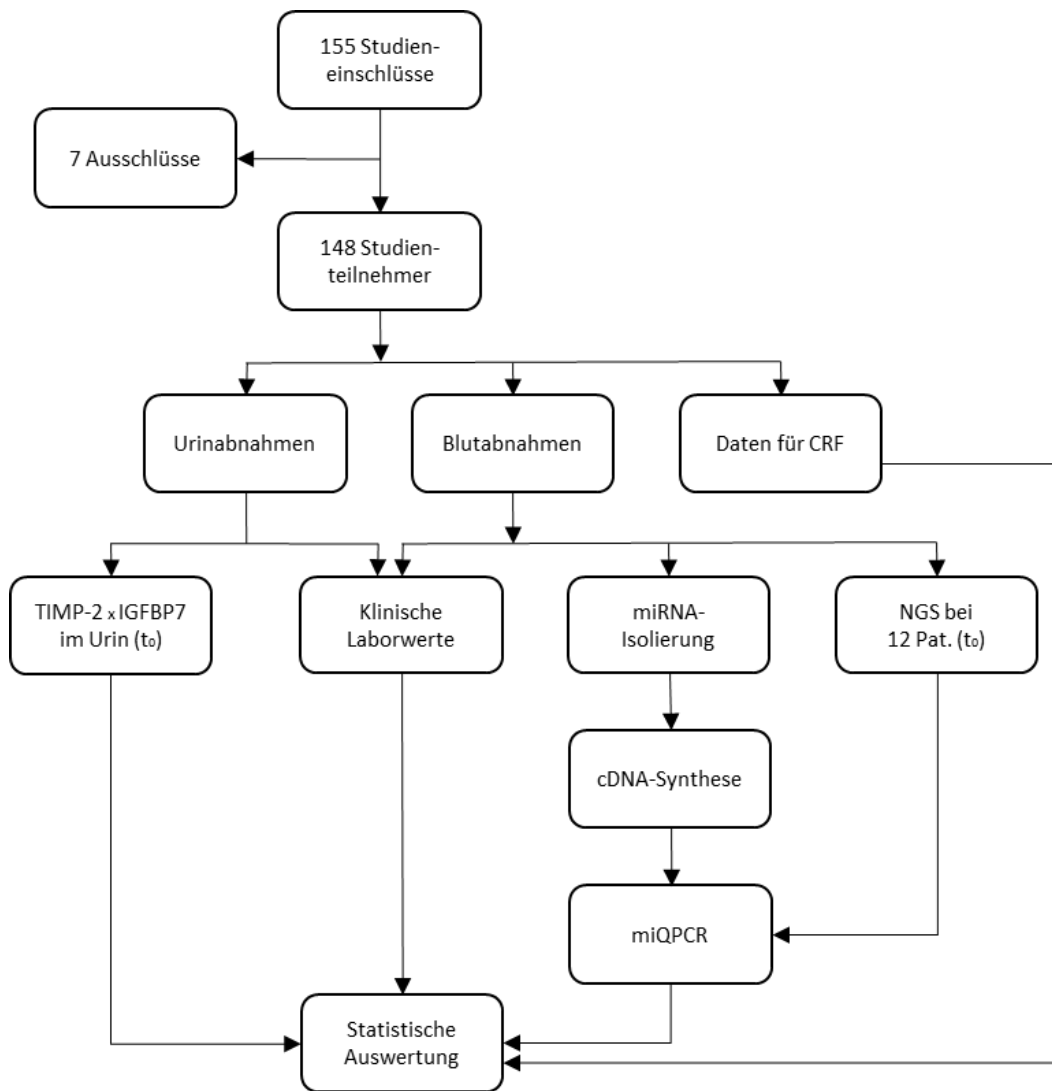


Abb. 2: Aufbau und Ablauf der Studie

CRF: Case Report Form, TIMP-2 x IGFBP7: Produkt aus Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 und insulin like growth factor-binding protein 7, t₀: Zeitpunkt t₀ (bei Ankunft auf Intensivstation), miRNA: micro ribonucleic acid (Mikroribonukleinsäure), NGS: Next Generation Sequencing, Pat.: Patienten, miQPCR: microRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Studie trägt den Titel „Nachweis von nicht-kodierender RNA zur Diagnose eines akuten Nierenversagens im Blut kardiochirurgischer Patienten (kurz: MiRAKI-Studie, *MicroRNAs in Acute Kidney Injury*)“ und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am 27.03.2017 positiv votiert. Die interne Studiennummer lautet: 5803R und die Registrierungs-ID: 2017024132.

In die MiRAKI-Studie wurden insgesamt 148 kardiochirurgische Patienten eingeschlossen, die zuvor schriftlich einwilligen und zwischen 18 und 90 Jahren alt sein mussten.

Die Ausschlusskriterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie innerhalb des letzten Monats
- Paralleler Einschluss in eine andere Studie
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Präexistierendes CNV, das einer regelmäßigen Dialyse bedarf
- Dialyse innerhalb der letzten drei Monate
- Patienten auf der Organspende- oder Kunstherz-Warteliste
- Z.n. Nierentransplantation
- Prä- oder postoperativer Einsatz eines extrakorporalen Organersatzverfahrens wie ECMO, ECLS, RVAD oder IABP
- Präoperative GFR < 30 ml/min/1,73m ²
- NAST
- Kontraindikation gegen die Entnahme einer 8-ml-Blut- bzw. Urinprobe

Tabelle 2: Ausschlusskriterien aus der MiRAKI-Studie

MiRAKI: MicroRNAs in Acute Kidney Injury (MicroRNAs bei akuter Nierenschädigung), CNV: chronisches Nierenversagen, Z.n.: Zustand nach, ECMO: Extrakorporale Membranoxygenierung, ECLS: Extracorporeal Life Support (extrakorporale Lebensunterstützung), RVAD: Right Ventricular Assist Device (rechtsventrikuläres Unterstützungssystem), IABP: intraaortale Ballonpumpe, GFR: glomeruläre Filtrationsrate, NAST: Nierenarterienstenose.

2.1.2 Probenentnahme

Die Probenentnahme fand zu jeweils vier Zeitpunkten statt: präoperativ vor der Operation nach Einleitung der Narkose ($t_{\text{prä}}$), bei Ankunft auf der Intensivstation (t_0), 24 Stunden (t_{24}) und schließlich 72 Stunden (t_{72}) nach Ankunft auf der Intensivstation (s. Abb. 3).

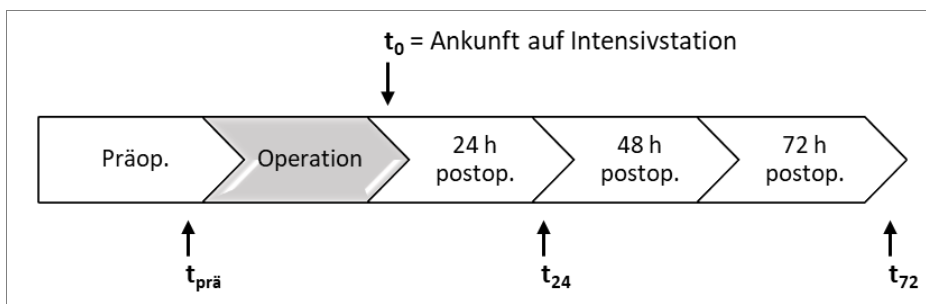


Abb. 3: Übersicht der vier Probenentnahmezeitpunkte

Probenentnahmezeitpunkte: präoperativ ($t_{\text{prä}}$), bei Ankunft auf Intensivstation (t_0), nach 24 Stunden (t_{24}) und nach 72 Stunden (t_{72}).

Es wurden bei jeder Probenentnahme 8 ml EDTA-Blut (Ethylendiamintetraacetat-Blut) aus einem zentralvenösen oder arteriellen Katheter und 8 ml Urin aus einem Harnblasenkatheter entnommen. Die postoperativ zu untersuchenden Blut- und Urinproben wurden unmittelbar nach Entnahme für fünf Minuten bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (bei den Blutproben Plasma genannt) schließlich in 1,5 – 2 ml fassende Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Probenverarbeitung aufbewahrt.

2.1.3 Case Report Form (CRF)

Zur Erfassung möglichst vieler Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer AKI müssen die individuellen Ausgangsmerkmale der Patienten erfasst werden. Dazu gehören relevante Vorerkrankungen, kardiovaskuläre Risikofaktoren, Risikoeinschätzungen für die Entwicklung einer AKI mittels spezifischer Tests, perioperative Einflussfaktoren wie Volumenbalance, Beatmungsparameter und sonstige laborchemischen Parameter. Für die Studie wurde eine pseudonymisierte Datentabelle (engl. *case report form*, CRF) erstellt, in die alle relevanten klinischen Daten von jedem Patienten eingetragen wurden, um sie später statistisch auszuwerten. Dafür wurden Arztbriefe, OP-Protokolle, Patientenkurven von Intensiv- und Normalstationen, sowie klinische Patientendokumentationsprogramme herangezogen.

Präoperativ wurden zwei verschiedene Scores für jeden Patienten errechnet – der STS (*Society of Thoracic Surgeons*) Score und der *Cleveland Clinic Score*. Der STS-Score wurde entwickelt, um Mortalität und Morbidität nach herzchirurgischen Eingriffen beim Erwachsenen anhand von demographischen und klinischen patientenspezifischen Merkmalen vorauszusagen [60-63]. Der Score wird regelmäßig durch die STS aktualisiert und wurde für diese Arbeit zum Stand von 2017 [64] ausgerechnet. Eine neue Version des Risikokalkulators [65, 66] wurde nicht mehr in dieser Arbeit berücksichtigt. Es wurde das Sterberisiko, das Risiko für die Entwicklung eines Nierenversagens (engl. *renal failure*) und das Risiko für einen Schlaganfall errechnet.

Der von Thakar et al. [67] entwickelte *Cleveland Clinic Score* dient der Einschätzung des Risikos für das Entstehen einer dialyspflichtigen AKI (AKI 3 nach KDIGO) nach einer Herzoperation.

Da zu den expositionsbezogenen Risikofaktoren einer AKI u.a. die Sepsis zählt (s. Kapitel 1.1.2), wurde in der MiRAKI-Studie postoperativ auch der SOFA-Score (engl. *sequential organ failure assessment*, Score zur Beurteilung des Organversagens bei Sepsis) errechnet. Dabei handelt es sich um eine Maßzahl, in die der Zustand von Atmungsfunktion, Herz-Kreislauf-System, Leberfunktion, Gerinnung, Nierenfunktion und des neurologischen Status eingeht. Ein Anstieg um mindestens zwei Punkte in der Kategorie für das jeweilige Organ spricht für eine

Organdysfunktion und kann damit ein Hinweis auf eine Sepsis sein. Der Score wird in der Intensivmedizin auch als Prädiktor der Mortalität herangezogen [68].

Der APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) Score dient zur Vorhersage der Überlebenschancen von Patienten auf Intensivstationen [69] und wurde für den Zeitpunkt t_0 errechnet.

2.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Durch die Firma Exiqon wurde eine komplette Sequenzierung der im Blut von 12 Patienten zum Zeitpunkt t_0 vorhandenen miRNAs durchgeführt. Es wurden sechs Patienten, die im Verlauf an höhergradiger AKI erkrankten, zufällig ausgewählt, und als Vergleichsgruppe dienten sechs Patienten ohne AKI mit ähnlichen Merkmalen (ähnlicher Eingriff/ OP-Dauer/ Alter/ etc.).

Eine differentielle Expressionsanalyse hat zum Ziel, Gene (oder in diesem Fall miRNAs) hervorzuheben, deren Expression bzw. Menge sich innerhalb des Experiments signifikant verändert [70]. Zur Quantifizierung der Expression einzelner RNAs kann eine RNA-Sequenzierung durchgeführt werden, wobei die Quantifizierung davon abhängt, wie häufig ein RNA-Stück in einer Sequenzierungsreaktion analysiert wurde (auch Anzahl der Reads genannt). Die Analyse der Genexpressionsdaten kann erst nach Normalisierung der Daten erfolgen, „weil die Stärke des beobachteten Signals häufig von technischen Bedingungen beeinflusst wird und deshalb nicht ohne Weiteres zwischen verschiedenen Proben übereinstimmt“ [71].

Laut Auftragspartner wurde als Instrument das NextSeq500 genutzt und jede Probe zehn Millionen Mal gelesen, mit einer durchschnittlichen Leselänge von je 75 Nukleotiden. Zur Erstellung einer Bibliothek wurde die Plattform *Illumina* benutzt und das Protokoll *QIAseq miRNA Library Kit* von Qiagen. Zur differentiellen Expressionsanalyse wurde die Software *edgeR* von Bioconductor unter Anwendung der TMM-Normalisierungsmethode (trimmed mean of M-values) [72] verwendet, welche dazu dient, biologische Variationen von technischen zu unterscheiden. Dabei werden die relativen Änderungen der Expressionsniveaus (logFC, s.u.) zwischen den verschiedenen Proben mit und ohne AKI untersucht [73].

Die Ergebnistabelle des Kooperationspartners (s. Tabelle 10) enthält außer TMM für jede identifizierte miRNA die Werte des logarithmischen Fold Change (logFC), logarithmischen Counts Per Million (logCPM), p-Werte und False Discovery Rate (FDR).

Fold change ist definiert als das Verhältnis der RNA-Expression zwischen zwei Proben [74] und ist ein relatives Maß zur Beschreibung, wie stark sich eine Größe zwischen zwei Messungen ändert (wie bspw. die Differentialexpression von AKI zu keiner AKI ist). In der statistischen Auswertung

von NGS-Daten wird zur einfacheren Darstellung der Daten der Logarithmus gebildet (logFC). LogFC wird auch als M-value bezeichnet [75].

LogCPM (logarithm of counts per million reads) ist die Anzahl der Reads, normalisiert auf eine Million Reads [75], und erlaubt somit Vergleiche zwischen verschiedenen Bibliotheken. Die FDR (False Discovery Rate, Falscherkennungsrate) ist der durch Benjamini und Hochberg [76] erstmals beschriebene erwartete Anteil von falsch-positiven Ergebnissen unter allen positiven Testentscheidungen und dient zur Schätzung der statistischen Signifikanz der differentiellen Expression. Fold changes mit angepassten p-Werten (FDR-Werten) unter 0,05 können als signifikant angesehen werden und haben eine höhere Chance, durch eine qPCR validiert zu werden [73].

Bei der Auswahl der miRNAs für die miQPCR wurden die FDR und miRNAs mit publikatorischer Relevanz im Kontext von AKI herangezogen. Schließlich wurden folgende drei miRNAs ausgewählt, die in dieser Arbeit näher untersucht werden sollten: miR-1, miR-16-5p und miR-122-5p (s. Kapitel 3.3).

MiR-1 gilt als im Herzen angereicherte miRNA, die u.a. nach einem Myokardinfarkt im Blut vermehrt nachweisbar ist und über die Nieren ausgeschieden wird [77]. Sie wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt, da diese Studie an einem herzchirurgischen Patientenkollektiv durchgeführt wurde und weil sie im NGS signifikant exprimiert ist (s. Kapitel 3.2).

Mir-16-5p wurde in Publikationen von Lorenzen et al. als vielversprechende miRNA identifiziert, die bei AKI herunterreguliert wird [57].

MiR-122-5p ist ebenfalls im NGS signifikant exprimiert (s. Kapitel 3.2). Experimentell wurde eine vermindert Expression bei Nierenschädigung im Tierversuch nachgewiesen [54], sodass eine nähere Untersuchung in der MiRAKI-Studie von Interesse schien.

2.3 Isolierung der miRNAs

Als Grundlage der RNA-Isolierung diente das *miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (50)* von Qiagen. Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für zehn Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, um größere extrazelluläre Fragmente, die bspw. noch mRNA enthalten, vollständig zu entfernen. Vom Überstand wurden 200 µl in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und 60 µl RPL-Puffer hinzugegeben und mit einem Vortexmischer durchmischt, um die Zell-Lyse und Denaturierung von Proteinkomplexen und RNasen herbeizuführen [78]. Nach einer dreiminütigen Ruhephase bei Raumtemperatur wurden 5 µl *C. elegans-microRNA-39 (Cel-miR-39)* mit einer Konzentration von 5 fmol/ml als interne Kontrolle

(engl. *spike-in*) hinzugegeben. Eine synthetisch hergestellte miR-39 wird oftmals als interne Kontrolle verwendet, um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können [78]. Im nächsten Schritt wurden 20 µl RPP-Puffer hinzugegeben und für 20 Sekunden mit einem Vortexmischer durchmischt und nach dreiminütiger Ruhephase bei Raumtemperatur für drei Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, um im Plasma vorhandene Proteine vom Überstand zu trennen. Der klare, die RNA enthaltende Überstand (ca. 210 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 210 µl Isopropanol vermischt, um einen geeigneten Bindungszustand der RNA-Moleküle zu schaffen. Als nächstes wurde das Gemisch in ein vom Hersteller mitgeliefertes Säulen-Reaktionsgefäß (RNeasy® UCP MinElute® Spin Column) gegeben und für 15 Sekunden bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert, sodass die gesamte RNA an die Membran in der Säule band. Der im Reaktionsgefäß unter der Membran gesammelte Durchfluss wurde entsorgt. Durch die darauffolgenden Waschschriffe wurden eventuell noch vorhandene Kontaminationen entfernt. Zuerst wurden 700 µl RWT-Puffer in die Säule gegeben und erneut für 15 Sekunden bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt, dann wurden 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Durchfluss weggeschüttet und schließlich wurden 500 µl 80 %-Ethanol hinzugegeben und für zwei Minuten bei 8000 g und 21 °C zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde entsorgt und die Säule in ein neues, 2 ml-fassendes Reaktions-Auffanggefäß gestellt und mit offenem Deckel für fünf Minuten bei 16000 g und 21 °C zentrifugiert, um die RNA in der Membran zu trocknen. Nach diesem Schritt wurde das Reaktions-Auffanggefäß erneut entsorgt und die Säule in ein neues 1,5 ml-fassendes Reaktionsgefäß gestellt und mit offenem Deckel unter einem Abzug für 15 Minuten luftgetrocknet. Um die RNA schließlich aus der Membran zu lösen, wurden 22 µl RNase-freies Wasser in die Säule gegeben und für eine Minute bei 16000 g und 21 °C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde vorsichtig erneut in die Säule pipettiert und ein weiteres Mal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert, um die gesamte RNA aus der Membran zu lösen. Die erhaltenen 18 µl RNA-Eluat wurden bei -80 °C bis zur Durchführung der microRNA-spezifischen quantitativen Echtzeit-PCR (miQPCR) aufbewahrt.

2.4 MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. **quantitative real time polymerase chain reaction**, qPCR) ist eine Standardmethode zum Nachweis und zur Quantifizierung von einer spezifischen Zielsequenz oder von Genexpressionsniveaus in einer Probe. Das Verfahren besteht aus drei Teilschritten: zunächst wird die zu untersuchende DNA denaturiert (in zwei Einzelstränge aufgeteilt), dann werden Primer an die komplementären Einzelstränge angeheftet (engl.

Annealing) und schließlich führt eine hitzestabile DNA-Polymerase die Verlängerung ausgehend von den Primern durch (Polymerisation). Durch Repetition mehrerer Zyklen kann eine millionenfache Replikation des ursprünglichen Fragments hergestellt werden. Ein in den Reaktionsansatz hinzugegebener fluoreszenzmarkierter Farbstoff (in diesem Versuchsansatz SYBR® Green I von Promega, s.u.) kann zur Echtzeitmessung der amplifizierten DNA genutzt werden, da die Fluoreszenz abhängig von der bereits amplifizierten DNA-Menge zunimmt. Die Amplifikation lässt sich als Kurve darstellen. Derjenige Punkt der Kurve, bei dem die exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments einsetzt, wird als *quantification cycle* (Cq) oder *threshold cycle* (Ct) bezeichnet. Ct steht im umgekehrten Verhältnis zur Menge des Ausgangsfragments in der Reaktion und ist ein relatives Maß für dessen Konzentration [79-81].

Um den Gehalt der oben genannten miRNAs zu den verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen und somit einen Anstieg oder einen Abfall der Konzentration im Blut zwischen den verschiedenen Zeitpunkten zu erkennen, wurde eine sogenannte **microRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR** (miQPCR) durchgeführt [82]. Das von Benes et al. beschriebene Prinzip wurde seit der Publikation 2015 [82] weiter verändert und in dieser Studie angewendet. Diese neuartige miQPCR wurde in der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. med. Timo Brandenburger in den Laboren der Klinik für experimentelle Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliert und in allen folgenden Versuchen angewendet.

MiQPCR ist eine innovative Methode, die speziell zur Quantifizierung der Expression von miRNAs entwickelt wurde und im Gegensatz zu bisherigen Methoden anpassungsfähig und kostengünstiger ist. Die Daten der Forschungsgruppe rund um Benes haben gezeigt, dass mit dem neuartigen Assay eine universelle reverse Transkription und anschließende Amplifikation jeder erdenklichen miRNA durchgeführt werden kann, da miRNA-spezifische Primer entworfen werden können. Das Assay bietet außerdem eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Unterscheidung eng verwandter Sequenzen und benötigt weniger Ausgangsmaterial (d.h. weniger RNA). Der Arbeitsaufwand pro Assay ist ebenfalls geringer als bei bisher verwendeten Methoden. Dieses Verfahren ist geeignet für die Analyse zirkulierender miRNAs, die in der MiRAKI-Studie untersucht wurden [82].

2.4.1 cDNA-Synthese

Als erstes wurde die aus dem Plasma isolierte RNA in cDNA (*complementary deoxyribonucleic acid*, komplementäre DNA) umgeschrieben (reverse Transkription), bevor sie in der PCR amplifiziert werden konnte.

Die Elongation der einzelsträngigen RNA-Moleküle wurde durch Anheftung eines universellen Verlängerungsstücks (miLinker) durchgeführt [82]. Dafür wurden 8 µl RNA in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 8 µl Tailing Mix 1 (T1) vermischt (s. Tabelle 3). Das Reaktionsgefäß wurde im PCR-Thermocycler für 30 Min. bei 25 °C inkubiert und dann auf 10 °C gekühlt (Abb. 4 zeigt die Temperaturen des Thermocyclers im Verlauf).

Tailing Mix 1	Volumen (µl)
10X Reaction Buffer (NEB)	1,8
MgCl ₂ (450 mM, final 5 mM) (Invitrogen)	0,2
PEG 8000 #B1004A (50 %, final 17,2 %) (NEB)	6,2
miLinker (15 µM)	0,2
Ribonuclease Inhibitor (RNaseOUT) (40 U/µl) (Invitrogen)	0,2
T4 RNA Ligase 2 (200 U/µl) (NEB)	0,2

Tabelle 3: Tailing Mix 1 (T1) (modifiziert nach Benes et al. [82])

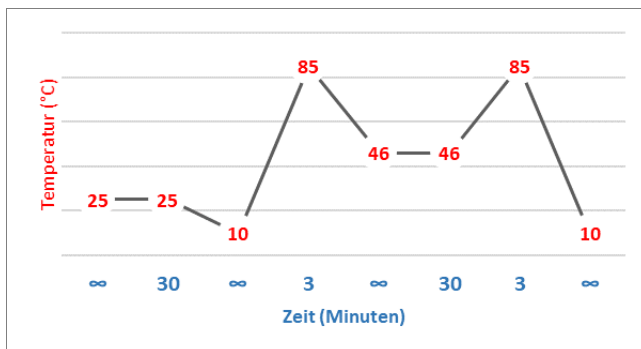


Abb. 4: Übersicht der Thermocycler-Temperaturen im Zeitverlauf

y-Achse: Temperaturstufe in °C angegeben, *x*-Achse: jeweilige Dauer des Schritts in Minuten, ∞: Verweildauer auf derselben Temperaturstufe, bis der nächste Schritt eingeleitet wird.

In den nächsten beiden Schritten fand schließlich die cDNA-Synthese durch reverse Transkription des verlängerten RNA-Stücks statt [82]. Dafür wurden bei 10 °C jeweils 4 µl Tailing Mix 2 (T2) (s. Tabelle 4) in die Reaktionsgefäße hinzugegeben, ohne sie dabei aus dem Thermocycler zu nehmen. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 85 °C für 3 Minuten. Bei 46 °C wurden jeweils 5 µl Tailing Mix 3 (T3) (s. Tabelle 5) hinzugegeben und die Proben erneut bei 85 °C für 3 Min. denaturiert und dann auf 10 °C gekühlt, bis das Programm beendet wurde. Die Reaktionsgefäße mit der erhaltenen cDNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tailing Mix 2	Volumen (µl)
TaqMan® dNTPs (10 mM) (Applied Biosystems)	0,5
mQ RT Primer (10 µM) (Eurofins)	0,25
Nukleasefreies Wasser (GoTaq®, Promega)	3,75

Tabelle 4: Tailing Mix 2 (T2) (modifiziert nach Benes et al. [82])

Tailing Mix 3	Volumen (µl)
5X RT PrimeScriptBuffer (Clontech Takara)	5,25
PrimeScript RTase (200 U/µl) (Clontech Takara)	0,25

Tabelle 5: Tailing Mix 3 (T3) (modifiziert nach Benes et al. [82])

2.4.2 Primer-Design

Zum Nachweis der ausgewählten miRNAs in der PCR benötigt man spezifische Primer, die sich an die miRNAs binden und sie amplifizieren. Die Primer zur Durchführung der miQPCR wurden nach folgendem Protokoll [83] entworfen. Auf www.miRbase.org wurden die Sequenzen für die jeweilige zu untersuchende miRNA herausgesucht und in DNA umgewandelt, indem alle Uracil-Basen zunächst durch Thymin ersetzt ($U \rightarrow T$) und eine Guanin-Base (G) am 3'-Ende ergänzt wurde. Im nächsten Schritt wurde der voraussichtliche T_m-Wert (*melting temperature*) anhand einer kommerziellen Software (www.thermofisher.com) ermittelt. Es handelt sich dabei um den Schmelzpunkt, bei dem 50% einer doppelsträngigen DNA als denaturierter Einzelstrang vorliegt [84]. Wenn der T_m-Wert zwischen 53 – 57 °C lag, wurde nichts verändert, lag er > 57 °C, wurden Nukleotide vom 5'-Ende der miRNA-Sequenz entfernt, bis der T_m-Wert im gewünschten Bereich war. Lag er < 52 °C, wurden weitere Nukleotide ans 3'-Ende der miRNA-Sequenz gehängt. Auf www.miRbase.org musste schließlich in einem letzten Schritt kontrolliert werden, dass keine Hybridisierungen des entworfenen Primers mit anderen miRNAs des gleichen Organismus möglich sind.

2.4.3 Echtzeitquantifizierung

Zunächst wurde für jede zu untersuchende miRNA ein eigener Mastermix (MM) erstellt (s. Tabelle 6). Die miRNA-Primer dienten der Detektion von miRNA-1, miR-16-5p, miR-122-5p oder Cel-miR-39. Es wurden 11 µl MM in jede Vertiefung der PCR-Platte pipettiert, sowie 4 µl cDNA der jeweiligen Patientenprobe.

Mastermix (inkl. 10% Pipettierverlust)	Volumen (µl)
Nukleasefreies Wasser (GoTaq®, Promega)	3,64
miRNA-Primer (100 µM) (Eurofins)	0,02
Upm2A (100 µM) (Eurofins)	0,02
SYBR® Green I (Promega)	8,3
CXR (Promega)	0,17

Tabelle 6: Mastermix (MM) (modifiziert nach Benes et al. [82])

Die PCR-Platten wurden nach folgendem Prinzip gestaltet:

- jede Patientenprobe wurde doppelt bestimmt, um Ungenauigkeiten bzw. Pipettierfehler möglichst auszuschließen,
- auf jeder Platte wurde RNase-freies Wasser anstelle von Patienten-cDNA als Negativkontrolle benutzt und
- zur Platten-übergreifenden Kontrolle wurde jeweils eine Poolprobe anstelle von Patienten-cDNA mit Primern für miR-16-5p und Cel-miR-39 benutzt. Dadurch sollten Unregelmäßigkeiten beim Pipettieren oder Verwenden des Thermocyclers ausgeschlossen werden.

Die Poolprobe wurde einmalig folgendermaßen erstellt: es wurde zehnmal die RNA-Isolierung (s. Kapitel 2.3) einer zufällig ausgesuchten Patientenplasmaprobe durchgeführt und die erhaltene Menge an miRNAs in ein einziges Reaktionsgefäß zusammengeführt, gemischt und in cDNA transkribiert (s. Kapitel 2.4.1). Die erhaltene cDNA wurde erneut zusammengeführt, gemischt und schließlich in Form von Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Einen beispielhaften Aufbau einer PCR-Platte zeigt Abb. 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Det:
A	58 t24	58 t24	59 t24	59 t24	58 t24	58 t24	59 t24	59 t24	58 t24	58 t24	59 t24	59 t24	miR-16
B	60 t24	60 t24	61 t24	61 t24	60 t24	60 t24	61 t24	61 t24	60 t24	60 t24	61 t24	61 t24	miR-122
C	62 t24	62 t24	63 t24	63 t24	62 t24	62 t24	63 t24	63 t24	62 t24	62 t24	63 t24	63 t24	miR-1
D	64 t24	64 t24	65 t24	65 t24	64 t24	64 t24	65 t24	65 t24	64 t24	64 t24	65 t24	65 t24	Cel-miR-39
E	66 t24	66 t24	67 t24	67 t24	66 t24	66 t24	67 t24	67 t24	66 t24	66 t24	67 t24	67 t24	
F	68 t24	68 t24	69 t24	69 t24	68 t24	68 t24	69 t24	69 t24	68 t24	68 t24	69 t24	69 t24	
G	70 t24	70 t24	71 t24	71 t24	70 t24	70 t24	71 t24	71 t24	70 t24	70 t24	71 t24	71 t24	
H	Poolprobe	Poolprobe	H2O	H2O			H2O	H2O	Poolprobe	Poolprobe	H2O	H2O	

Abb. 5: Schematischer Aufbau einer der PCR-Platten

Die Zahlen geben die Probennummer und den jeweiligen Zeitpunkt an, bspw. Probennummer 58 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Operation in Vertiefung A1. Farblich unterschiedlich hervorgehoben sind die Primer der jeweils zu untersuchenden miRNA

Der PCR-Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert: 2 Min. bei 95 °C, 50 Wiederholungen von 15 Sek. bei 95 °C und 35 Sek. bei 60 °C und anschließend 15 Sek. bei 95 °C, 1 Min. bei 60 °C, 15 Sek. bei 95 °C und 15 Sek. bei 60 °C (s. Abb. 6).

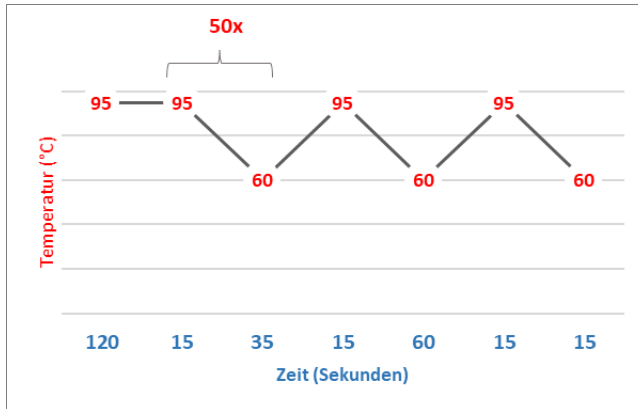


Abb. 6: Übersicht der Thermocycler-Temperaturen im Zeitverlauf

y-Achse: Temperaturstufe in °C, x-Achse: jeweilige Dauer des Schritts in Sekunden.

Mithilfe der Software *7300 System* von Applied Biosystems Singapore [85] wurden schließlich für alle Proben die jeweiligen Ct-Werte errechnet. Sie beschreiben den Anfang der exponentiellen Vermehrung des untersuchten DNA-Fragments in einer Echtzeit-PCR [79]. Je geringer ein Ct-Wert ist, desto früher beginnt die exponentielle Vermehrung und desto stärker ist daher die Expression bzw. vorhandene Menge des untersuchten Materials. Ein Vergleich von Ct-Werten zwei verschiedener Proben kann zeigen, welche vor der Amplifizierung mehr DNA enthielt.

Da jeder Patientenprobe während der Isolation der miRNAs die gleiche Menge an synthetisch hergestellter Cel-miR-39 zugeführt wurde (s. Kapitel 2.3), ist davon auszugehen, dass sich auch in allen für die PCR genutzten cDNA-Proben die gleiche Menge an Cel-miR-39 befindet. Die Ct-Werte von Cel-miR-39 sollten also in allen Patientenproben zu allen Zeitpunkten gleich sein und als Bezugspunkt dienen. Obwohl man keine absoluten Ct-Werte betrachten sollte, weil sie einen Punkt auf einer exponentiellen Kurve darstellen, ist der Wert in diesem Fall dennoch ein guter Hinweis dafür, ob die RNA-Isolierung und/ oder das miQPCR-Assay gleichmäßig durchgeführt wurde.

Zur Normierung wurde vom jeweiligen Ct-Wert von miR-1, -16-5p und -122-5p der zum Patienten und Zeitpunkt zugehörige Ct-Wert von Cel-miR-39 subtrahiert:

$$\text{bspw. } \Delta\text{Ct}_{\text{miR-1}} = \text{Ct}_{\text{miR-1 Pat.X t0}} - \text{Ct}_{\text{miR-39 Pat.X t0}}$$

Mit den genormten Ct-Werten der verschiedenen miRNAs wurde dann mit der Verarbeitungs- und Analysesoftware für qPCR-Daten *GeneExTM* von MultiD zu den drei postoperativen Zeitpunkten (bei Ankunft auf Intensivstation, am ersten und am dritten postoperativen Tag) eine Varianzanalyse durchgeführt.

2.5 TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI

Der Risikoeinschätzungstest für AKI der Firma Astute Medical (NephroCheck[®]) wird von klinischen Experten in Europa und Nordamerika mittlerweile standardmäßig zur AKI-Risikostratifizierung von Patienten genutzt, die sich einer größeren Operation (sowohl herzchirurgisch als auch nicht-herzchirurgisch) unterziehen, die hämodynamisch instabil sind oder eine Sepsis haben [86]. Gemessen wird das Produkt der Konzentrationen von TIMP-2 und IGFBP7 (in ng/ml) geteilt durch 1000 [87]. Das Ergebnis ist der sog. AKI-Risk[®]-Score. Ein Wert > 0,3 geht mit einem erhöhten Risiko einher, an einer AKI 2 oder 3 nach KDIGO innerhalb von 12 Stunden nach Testdurchführung zu erkranken oder innerhalb von 30 Tagen zu versterben, dialysepflichtig zu werden oder an permanenter Nierendysfunktion zu erkranken [87]. Der Hersteller betont, dass der Test in Verbindung mit der klinischen Einschätzung der Patienten angewendet werden sollte [87]. Um das AKI-Risiko in der MiRAKI-Studie darzustellen, wurde der Test an den Urinproben des Zeitpunkts t_0 (Ankunft auf Intensivstation), wie in den Herstellerangaben empfohlen, durchgeführt.

2.6 Methoden der Datenverarbeitung

2.6.1 World Wide Web tools

Die Sequenzen der reifen miRNAs (s. Kapitel 2.4.2) wurden von der Datenbank *miRBase* heruntergeladen: <http://www.mirbase.org/>.

Die voraussichtlichen T_m -Werte (s. Kapitel 2.4.2) wurden mit dem *T_m calculator* von Thermofisher berechnet: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.

Der STS (Society of Thoracic Surgeons) Score (s. Kapitel 2.1.3) wurde mithilfe des Rechners von folgender Website berechnet (Stand 2017-2018): <http://riskcalc.sts.org/stswebriskcalc/calculate>.

Der Cleveland Clinic Score (s. Kapitel 2.1.3) wurde mithilfe des Rechners von folgender Website berechnet (Stand 2017-2018): https://qxmd.com/calculate/calculator_55/dialysis-risk-after-cardiac-surgery-cleveland-clinic-score-by-thakar.

2.6.2 Statistische Auswertung

Nach statistischer Beratung durch PD Dr. P. Verde (Koordinierungszentrum für Klinische Studien) wurde für Kardinalwerte wie bspw. Laborwerte eine einfache Varianzanalyse (engl. *one-way ANOVA, analysis of variance*) und als Post-hoc-Test der Bonferroni-Test durchgeführt ($\alpha = 0,05$, 95 % Konfidenzintervall (KI), 3 Nachkommastellen). Im Post-hoc-Test wurden jeweils die Gruppe AKI 0 vs. AKI 1, sowie AKI 0 vs. AKI 2 & 3 gegeneinander getestet. Lediglich für den Cleveland Clinic Score (s. Kapitel 3.7.3) wurde aufgrund einer nicht-parametrischen Verteilung der Werte ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt und als Post-hoc-Test der Dunn-Test zum Vergleich mehrerer Gruppen. Wenn innerhalb eines Zeitraumes mehrere Laborwerte vorhanden waren, wurde für die statistische Auswertung der jeweils höchste Wert ausgewählt. Lediglich für Natrium, Calcium, Basenabweichung (engl. *Base Excess*), pH, Sauerstoffpartialdruck ($p\text{aO}_2$), Kohlendioxidpartialdruck ($p\text{aCO}_2$) und Sauerstoffsättigung (SaO_2) wurde der niedrigste Wert gewählt.

Die kategoriellen Daten wurden mit dem exakten Fisher-Test ausgewertet und werden mit Odd's Ratio (OR) und Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad Prism 5*.

Mit der Software *GeneEx™* von MultiD wurden die miQPCR-Daten ebenfalls in einer Varianzanalyse auf ihre Signifikanz hin untersucht.

P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.7 Material

2.7.1 Reagenzien

Firma	Produktname	Artikelnummer
Applied Biosystems	TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (dNTPs)	4366596
Clontech Takara	PrimeScript™ Reverse Transcriptase	2680A
Carl Roth®	Ethanol $\geq 99,5$ %, Ph.Eur., reinst	5054.1
Carl Roth®	2-Propanol Rotislov® HPLC	7343.2

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

Eurofins Genomics	Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen (5'→3'): - Cel-miR-39: UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (22) (RNA) - mQ RT: CCCAGTTATGGCCGTTTATGCAGGT (25) - Upm2A: CCCAGTTATGGCCGTTTA (18) - miR-1: TGAATGTAAAGAAGTATGTATG (23) - miR-16-5p: CAGCACGTAAATATTGGCGG (20) - miR-122-5p: GTGTGACAATGGTGTGG (19) - Cel-miR-39-3p: CCGGGTGAAATCAGCTTGG (20) (Primer) - miLinker: CCGTTTATGCAGGTCGTAGTTCGGCCT (27) [82] (Leihgabe mit freundlicher Unterstützung durch Dr. rer. nat. Mirco Castoldi)	
Invitrogen by ThermoFisher Scientific	RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor (Recombinant)	10777-019
Invitrogen by ThermoFisher Scientific	1M MgCl ₂ Buffer Kit	AM9530G
New England BioLabs	T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q	M0351L
Promega	GoTaq® qPCR Master Mix	A6002
Qiagen	miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (50)	217204
Qiagen	QIAseq miRNA Library Kit (12) / (96)	331502 / 331505

Tabelle 7: Reagenzien

2.7.2 Geräte und Materialien für Probenaufbewahrung

Firma	Gerätename/ Gegenstand
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Astute Medical, San Diego	NephroCheck® Test Kit
Binder	Inkubator
Bio-Rad Singapore	C1000™ Thermal Cycler
Biozym, Eppendorf und Sarstedt AG & Co	Reaktionsgefäße für verschiedene Volumina (0,2 bis 2 ml)
Becton Dickinson	BD Vacutainer® EDTA Röhrchen (3 ml) und Urinröhrchen (11 ml)
Eppendorf	Pipetten für verschiedene Volumina (2,5 µl bis 1000 µl)
Eppendorf	Centrifuge 5417R
Illumina	NextSeq500
Hettich	Zentrifuge Rotina 420R
Radiometer	ABL800 FLEX BGA Gerät
Scientific Industries	Vortex Genie 1 - Touch Mixer
VWR International	Galaxy Mini Centrifuge

Tabelle 8: Geräte und Materialien für Probenaufbewahrung

2.7.3 Software

Firma	Programm
Applied Biosystems	7300 System
Bioconductor	edgeR (Software für Verarbeitung und Analyse von Genexpressionsdaten)
Clarivate Analytics	Endnote X8
GraphPad	Prism 5 (Statistikprogramm)
Microsoft	Word und Excel
MultiD	GeneEx™ (Software für Verarbeitung und Analyse von qPCR-Daten)

Tabelle 9: Software

3 Ergebnisse

3.1 Inzidenz von AKI in der MiRAKI-Studie

Von den 148 herzchirurgischen Patienten entwickelten 102 keine AKI, 33 konnten dem Stadium 1 (leichte akute Nierenschädigung), drei dem Stadium 2 und neun dem Stadium 3 nach KDIGO zugeordnet werden. Die Stadien AKI 2 und 3 wurden zu einer gemeinsamen Gruppe (höher- und hochgradige AKI) zusammengefasst, die 13 Patienten umfasst, da sich AKI oft fließend von einer Stufe in die nächsthöhere entwickelt und leicht unterschiedliche Messzeitpunkte bereits zu einer Einteilung eines Patienten in den nächsthöheren Schweregrad führen können. Der postoperative Zeitraum von sieben Tagen wurde ausgewählt, um die Patienten einem AKI-Stadium zuzuteilen. Abb. 7a-b zeigt das Auftreten von AKI in der MiRAKI-Studie in absoluten und relativen Zahlen.

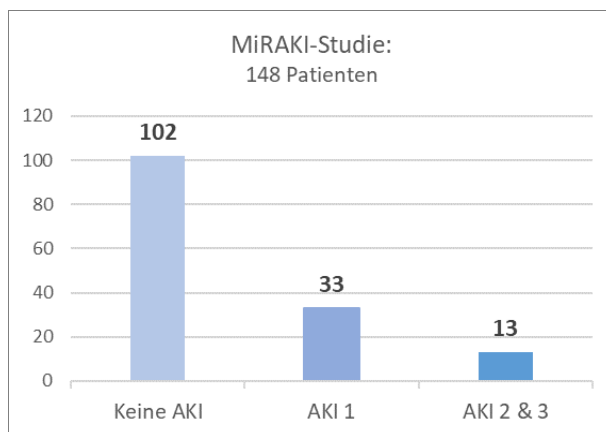


Abb. 7a: Auftreten von AKI (absolut)

y-Achse: absolute Patientenzahlen, x-Achse: AKI-Schweregrade. AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung).

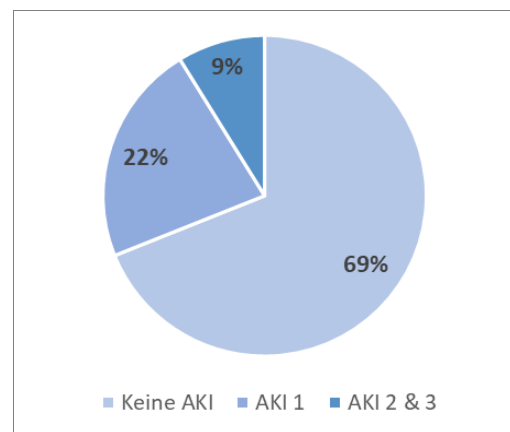


Abb. 7b: Auftreten von AKI (relativ)

AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung).

3.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Bei der Sequenzierung der miRNAs in den 6 vs. 6 Proben (6 Patienten ohne AKI und 6 Patienten mit AKI 2 & 3) lag der Q-Score, als Maß für die Qualität der eingesetzten Proben, bei allen diesen über 30 und damit in einem hohen Niveaubereich [73].

MiR-1 und miR-122-5p sind statistisch signifikant differentiell exprimiert beim Vergleich von Patienten mit höhergradiger AKI und ohne AKI. MiR-1 ist dabei in AKI-Patienten geringer exprimiert als bei Patienten ohne AKI ($p = 0,0001$) und miR-122-5p ist höher exprimiert bei AKI-Patienten ($p = 0,016$). MiR-16-5p ist bei AKI-Patienten geringer exprimiert, zeigt jedoch keine statistische Signifikanz. MiR-1 ist eine von fünf miRNAs, die signifikant differentiell exprimiert ist

mit einem Signifikanzniveau von $FDR \leq 0,05$ (s. Tabelle 10). Der nach Benjamini-Hochberg korrigierte p-Wert (FDR) von miR-122-5p ist nicht statistisch signifikant. Die höchsten TMM-Werte und Anzahl von Reads (logCPM) zeigen sich bei Patienten mit und ohne AKI bei miR-16-5p, die somit in den NGS-Proben quantitativ am höchsten exprimiert vorkommt [88].

Name	AKI (TMM)	Keine AKI (TMM)	logFC	logCPM	p-Wert	FDR
hsa-miR-1	973	4 348	-2,159	11,378	0,0001	0,015
hsa-miR-16-5p	303 162	386 542	-0,351	18,396	0,235	0,781
hsa-miR-122-5p	49 615	19 355	1,358	15,074	0,016	0,546

Tabelle 10: Ausgewählte miRNAs für die miQPCR (modifiziert aus der Exiqon-Ergebnisdatenbank [88])

hsa-miR: Homo sapiens microRNA. Durchschnittliche TMM-Werte (trimmed mean of M-values, eine Normalisierungsmethode um Proben vergleichbar zu machen) für Patienten mit und ohne AKI. logFC (log₂ fold change): Differentialexpression bzw. Ratio von AKI zu keiner AKI (= $\log_2(TMM_{AKI}/TMM_{keine\ AKI})$). logCPM (log₂ counts per million sequencing reads): Expressionswert normalisiert über alle verglichenen Proben. FDR (False Discovery Rate): Falscherkennungsrate, nach Benjamini-Hochberg korrigierte p-Werte. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.3 MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (miQPCR)

Die Ergebnisse stellen sich, wie oben erwähnt, in Form von sogenannten Ct-Werten (s. Kapitel 2.4) dar. Die relativen Expressionslevel von miR-1, -16-5p und -122-5p nach Normierung sind in Abb. 8a-c und Tabellen 11-13) dargestellt. Die postoperative Dynamik zeigt relativ ähnliche Verläufe bei allen drei miRNAs.

Zunehmende Ct-Werte der miR-1 bei allen untersuchten Gruppen stehen für eine abnehmende Expression im postoperativen Verlauf.

MiR-16-5p zeigt eine ähnliche Dynamik für Patienten ohne und mit höhergradiger AKI. In der AKI 1-Gruppe zeigt sich am ersten postoperativen Tag zunächst auch eine geringere Expression als unmittelbar nach der OP, jedoch steigt diese am dritten postoperativen Tag wieder etwas an.

Für miR-122-5p zeigt sich bei Patienten mit AKI (1, 2 & 3) ebenfalls eine abnehmende Expression im postoperativen Verlauf. Patienten ohne AKI zeigen am ersten postoperativen Tag auch eine erst abnehmende Expression, die am dritten postoperativen Tag wieder ansteigt.

Tabelle 11: Relative Expression der untersuchten miRNAs nach Normierung zum Zeitpunkt t₀ (bei Ankunft auf Intensivstation)

miRNA	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert 0 vs. 1	p-Wert 0 vs. 2 & 3
miR-1	11,45 (± 2,61)	12,32 (± 3,31)	12,2 (± 1,86)	0,117	0,321
miR-16-5p	1,78 (± 1,55)	1,86 (± 1,23)	1,79 (± 1,13)	0,785	0,978
miR-122-5p	6,85 (± 2,09)	6,4 (± 2,83)	6,27 (± 2,09)	0,324	0,351

Angegeben sind die Ct-Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) nach Subtraktion des jeweiligen Cel-miR-39-Ct-Wertes. Ct: threshold cycle (Beginn der exponentiellen Vermehrung des untersuchten Fragments in der PCR). Die p-Werte wurden mit einer ANOVA errechnet und sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben.

Tabelle 12: Relative Expression der untersuchten miRNAs nach Normierung zum Zeitpunkt t₂₄ (erster postoperativer Tag)

miRNA	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert 0 vs. 1	p-Wert 0 vs. 2 & 3
miR-1	15,64 (± 3,01)	15,72 (± 3,59)	15,85 (± 4,9)	0,904	0,829
miR-16-5p	3,25 (± 1,1)	3,39 (± 1,35)	3,18 (± 1,29)	0,544	0,827
miR-122-5p	10,91 (± 3,04)	9,97 (± 3,55)	8,29 (± 3,54)	0,131	0,004

Angegeben sind die Ct-Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) nach Subtraktion des jeweiligen Cel-miR-39-Ct-Wertes. Ct: threshold cycle (Beginn der exponentiellen Vermehrung des untersuchten Fragments in der PCR). Die p-Werte wurden mit einer ANOVA errechnet und sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

Tabelle 13: Relative Expression der untersuchten miRNAs nach Normierung zum Zeitpunkt t₇₂ (dritter postoperativer Tag)

miRNA	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert 0 vs. 1	p-Wert 0 vs. 2 & 3
miR-1	17,34 (± 3,23)	16,37 (± 2,38)	17,03 (± 4,01)	0,184	0,771
miR-16-5p	3,49 (± 1,93)	3,34 (± 1,83)	3,61 (± 1,06)	0,702	0,825
miR-122-5p	10,23 (± 5,27)	10,5 (± 4,53)	8,68 (± 3,64)	0,801	0,33

Angegeben sind die Ct-Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) nach Subtraktion des jeweiligen Cel-miR-39-Ct-Wertes. Ct: threshold cycle (Beginn der exponentiellen Vermehrung des untersuchten Fragments in der PCR). Die p-Werte wurden mit einer ANOVA errechnet und sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben.

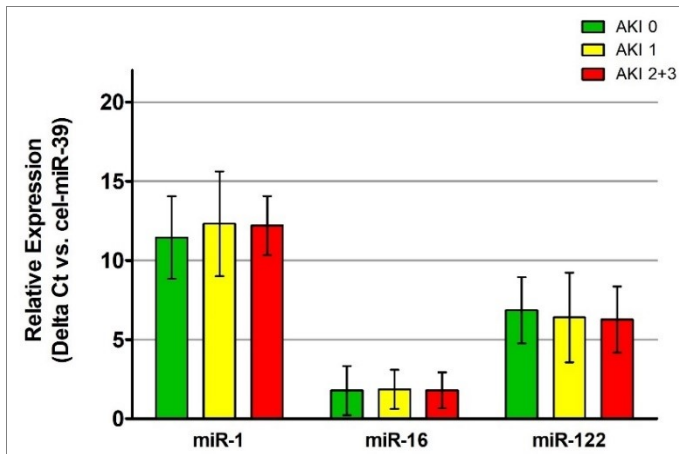


Abb. 8a: Relative Expression der untersuchten miRNAs an t_0 nach Normierung

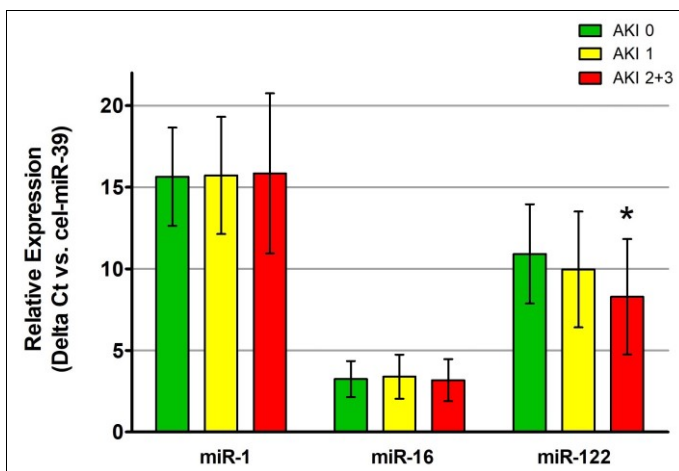


Abb. 8b: Relative Expression der untersuchten miRNAs an t_{24} nach Normierung

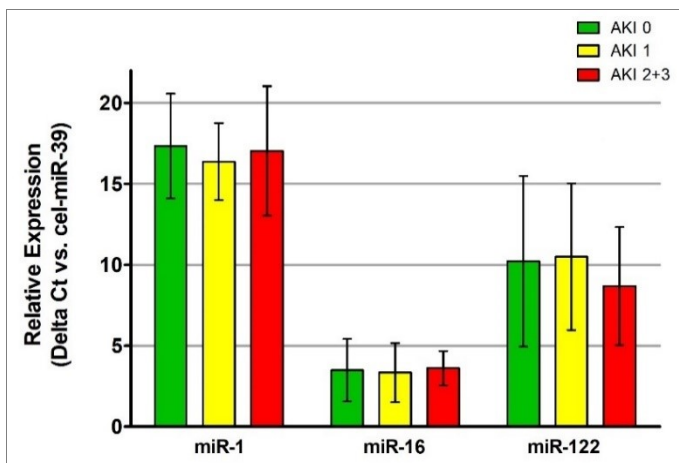


Abb. 8c: Relative Expression der untersuchten miRNAs an t_{72} nach Normierung

Abb. 8a-c: Angegeben sind die Ct-Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) nach Subtraktion des jeweiligen Cel-miR-39-Ct-Wertes. Ct: threshold cycle (Beginn der exponentiellen Vermehrung des untersuchten Fragments in der PCR), miR: micro ribonucleic acid (Mikroribonukleinsäure), AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung), t_0 : Ankunft auf Intensivstation, t_{24} : 24 Stunden nach Operation, t_{72} : 72 Stunden nach Operation. Signifikante Werte sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die relative Expression der untersuchten miRNAs zeigt beim Vergleich von Patienten mit und ohne AKI sehr unterschiedliche Verläufe (s. Abb. 9).

Bei Patienten mit AKI (AKI 1, 2 & 3) ist die Expression von miR-1 kurz nach der OP (t_0) und am ersten postoperativen Tag (t_{24}) vermindert im Vergleich zu Patienten ohne AKI, jedoch am dritten postoperativen Tag (t_{72}) erhöht.

MiR-16-5p zeigt einen ähnlichen Verlauf bei Patienten mit AKI 1. Bei Patienten mit AKI 2 & 3 ist miR-16 nach der OP (t_0) geringer exprimiert, übersteigt am ersten postoperativen Tag (t_{24}) die Expression von gesunden Patienten und fällt am dritten postoperativen Tag (t_{72}) wieder unterhalb des Expressionsniveaus von Patienten ohne AKI.

MiR-122-5p ist als einzige miRNA bereits bei Ankunft auf Intensivstation bei allen AKI-Patienten gegenüber Patienten ohne AKI erhöht exprimiert. Auch am ersten postoperativen Tag ist die Expression von miR-122-5p höher bei AKI-Patienten, wobei das Expressionsniveau bei Patienten, die eine höhergradige AKI entwickelten oder noch entwickeln würden (AKI 2 & 3) signifikant höher ist als bei den gesunden Kontrollen ($p = 0,004$). Am dritten postoperativen Tag bleibt die Expression bei Patienten mit AKI 2 & 3 weiter erhöht und bei Patienten mit AKI 1 erniedrigt im Vergleich mit Patienten ohne AKI.

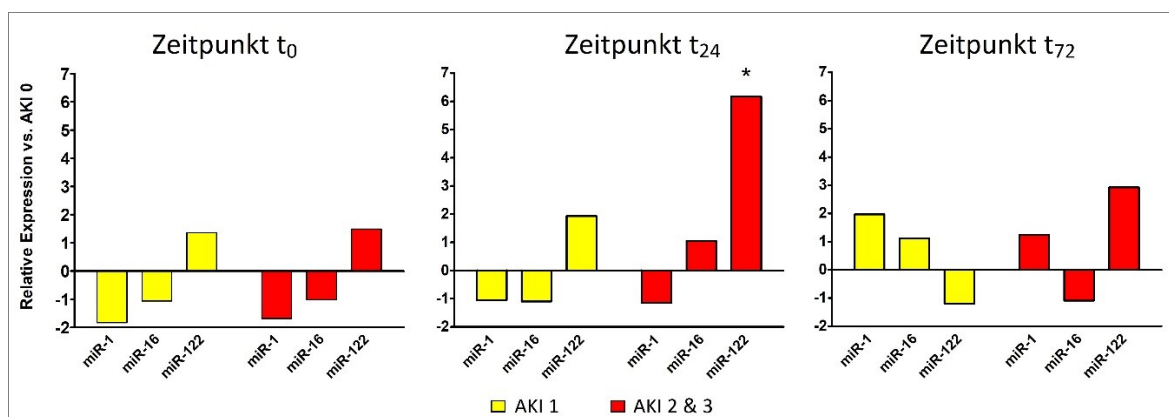


Abb. 9: Relative Expression der untersuchten miRNAs der Gruppe AKI 1 und AKI 2 & 3 gegenüber der Gruppe ohne AKI zu allen drei postoperativen Zeitpunkten

miR: micro ribonucleic acid (Mikroribonukleinsäure), AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung), t_0 : Ankunft auf Intensivstation, t_{24} : 24 Stunden nach Operation, t_{72} : 72 Stunden nach Operation. Signifikante Werte sind mit einem Sternchen () gekennzeichnet.*

Der Ct-Mittelwert zur Bestimmung von Cel-miR-39 als endogener Kontrollmarker (Intra-Assay-Validität) in allen Patientenproben liegt bei 20,86 (SD (standard deviation, Standardabweichung) 2,57). Zur Überprüfung der Inter-Assay-Validität der Ergebnisse wurden auf jeder

PCR-Platte zwei Doppelbestimmungen einer Poolprobe und eine Doppelbestimmung mit Wasser gemacht (s. Kapitel 2.4.3). Der Ct-Mittelwert für miR-16-5p in den Poolproben ist 27,54 (SD 0,23) und für Cel-miR-39 23,41 (SD 0,27). Die Doppelbestimmung mit Wasser zeigt bei keiner der 67 Platten jeglichen Nachweis von miRNAs.

3.4 TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, wurde ein AKI-Risikoeinschätzungstest an den Proben des Zeitpunktes t_0 durchgeführt. Da ein AKI-Risk[®]-Score > 0,3 von Kashani et al. [38] als Grenzwert definiert wurde für ein erhöhtes AKI- und Mortalitätsrisiko, wurde der Test in der MiRAKI-Studie anhand dieses Cutoffs ausgewertet. Tabelle 14 zeigt die Mittelwerte der AKI-Risk[®]-Scores in den verschiedenen Gruppen. Im exakten Fisher-Test zeigt sich beim Vergleich von Patienten ohne und mit leichter bzw. höhergradiger AKI, dass Patienten mit AKI 2 & 3 signifikant häufiger der Gruppe mit erhöhtem AKI-Risk[®]-Score > 0,3 angehören. Die AUC (*area under the curve*) beträgt in der MiRAKI-Studie beim Vergleich von Patienten ohne und mit höhergradiger AKI 0,82 (SD 0,06, KI 0,71 – 0,93, $p = 0,0001$) (s. Abb. 10).

Da das Produkt dieser beiden Proteine bei Diabetikern oftmals erhöht ist [39], wurden die Patienten in zwei Gruppen geteilt (Diabetiker und Nicht-Diabetiker) und die Mittelwerte der AKI-Risk[®]-Scores separat für diese beiden Gruppen berechnet, ebenso wie die statistische Wahrscheinlichkeit, einen erhöhten Score > 0,3 zu haben (s. Tabelle 14).

	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	AKI 0 vs. 1			AKI 0 vs. 2 & 3		
				p-Wert	OR	KI	p-Wert	OR	KI
AKI-Risk[®]-Score	0,92 (±4,57)	0,7 (±1,35)	2,07 (±3,14)	0,384	0,67	0,29 bis 1,54	0,001	0,12	0,03 bis 0,45
Diabetiker	1,07 (±3,45)	0,44 (±0,72)	3,39 (±4,29)	1,0	1,0	0,25 bis 3,93	0,076	0,13	0,01 bis 1,23
Nicht-Diabetiker	0,87 (±4,92)	0,87 (±1,63)	0,93 (±1,08)	0,393	0,59	0,2 bis 1,69	0,017	0,13	0,02 bis 0,71

Tabelle 14: AKI-Risk[®]-Scores

Angegeben sind die AKI-Risk[®]-Scores insgesamt und getrennt betrachtet für Diabetiker und Nicht-Diabetiker. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden mittels exaktem Fisher-Test errechnet und mit Odd's Ratio (OR) und 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

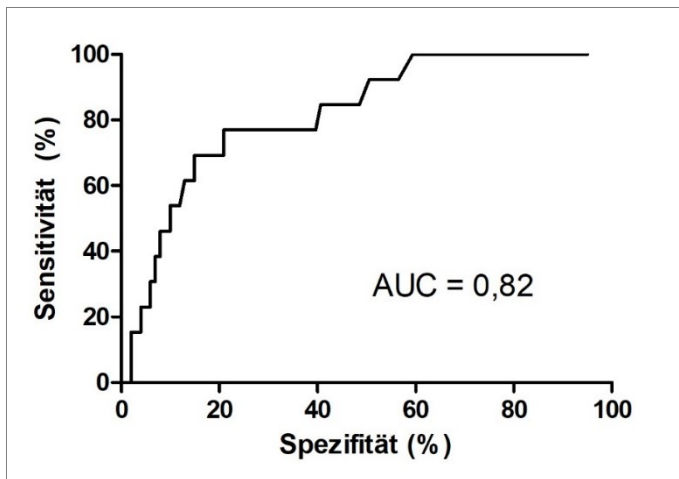


Abb. 10: Receiver operating curve (ROC) von AKI 0 vs. AKI 2 & 3

AUC: area under the curve (Fläche unter der Kurve)

3.5 Nierenfunktionsparameter, Diurese und Volumenbalance

Zu allen untersuchten Zeitpunkten (präoperativ, unmittelbar postoperativ und in den ersten sieben postoperativen Tagen) ist das Kreatinin signifikant höher bei Patienten mit leichter und höhergradiger AKI als bei Patienten ohne AKI (bspw. 1,29 mg/dl (SD 0,34) bei AKI 2 & 3 vs. 1,03 mg/dl (SD 0,27) bei AKI 0 zum Zeitpunkt t_0 , $p = 0,0003$). Die weiteren Werte können Tabelle 15 entnommen werden.

Unmittelbar postoperativ zeigen sich signifikant höhere Serum-Cystatin-Werte für Patienten mit leichter und höhergradiger AKI (1,46 mg/l (SD 0,43) bei AKI 2 & 3) im Vergleich mit Patienten ohne AKI (1,04 mg/l (SD 0,27), $p < 0,0001$). Auch am ersten, dritten und vierten bis siebten postoperativen Tag ist Cystatin C bei AKI-Patienten signifikant erhöht. Zur Auswertung am zweiten postoperativen Tag liegen nicht ausreichend Daten vor. Analog zeigt sich die aus den Cystatin-Werten errechnete GFR signifikant niedriger bei Patienten mit leichter und höhergradiger AKI (bspw. 51,7 ml/min (SD 21,5) bei AKI 2 & 3 zum Zeitpunkt t_0) im Vergleich mit Patienten ohne AKI (74,6 ml/min (SD 22,9), $p = 0,0002$). Die GFR-Cystatin am dritten postoperativen Tag zeigt eine Signifikanz an, die sich jedoch für keine der untersuchten Gruppen im Post-Test bestätigen ließ.

Auch die Harnstoffkonzentration ist zu allen postoperativen Zeitpunkten bei Patienten mit vor allem höhergradiger AKI signifikant höher als bei Patienten ohne AKI: bspw. 64,8 mg/dl (SD 23) bei AKI 2 & 3 vs. 36,9 mg/dl (SD 16,3) bei AKI 0 ($p < 0,0001$) am ersten postoperativen Tag (t_{24}).

Die Urinanalyse bei Ankunft auf der Intensivstation (t_0) nach herzchirurgischem Eingriff zeigt signifikant höhere Werte der Protein-, Albumin-, α_1 -Mikroglobulin- und IgG-Konzentration bei

Patienten mit AKI 2 & 3 verglichen mit Patienten ohne AKI. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Nierenfunktionsparametern sind in Tabelle 15 zu finden.

Nierenparameter	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Kreatinin (mg/dl):						
präop	1,16 (±0,33)	1,38 (±0,34)	1,45 (±0,71)	0,002	-0,41 bis -0,04	-0,56 bis -0,02
t₀	1,03 (±0,27)	1,23 (±0,34)	1,29 (±0,34)	0,0003	-0,34 bis -0,06	-0,48 bis -0,04
t₂₄	1,08 (±0,3)	1,51 (±0,4)	1,88 (±0,45)	< 0,0001	-0,6 bis -0,27	-1,05 bis -0,57
t₄₈	1,0 (±0,32)	1,63 (±0,51)	2,02 (±0,84)	< 0,0001	-0,85 bis -0,41	-1,34 bis -0,71
t₇₂	0,96 (±0,32)	1,62 (±0,57)	2,11 (±1,31)	< 0,0001	-0,93 bis -0,39	-1,54 bis -0,76
d₄₋₇	1,01 (±0,29)	1,66 (±0,49)	2,38 (±1,21)	< 0,0001	-0,88 bis -0,41	-1,72 bis -1,02
Cystatin C (mg/l):						
präop	1,46 (±0,18)	1,56 (±0,41)	1,46 (±0,64)	0,959	-1,7 bis 1,51	-1,76 bis 1,77
t₀	1,04 (±0,27)	1,22 (±0,25)	1,46 (±0,43)	< 0,0001	-0,32 bis -0,04	-0,66 bis -0,18
t₂₄	1,12 (±0,3)	1,49 (±0,32)	2,02 (±0,56)	< 0,0001	-0,54 bis -0,19	-1,14 bis -0,65
t₄₈	1,96 (±0,35)	1,74 (±0,58)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
t₇₂	1,2 (±0,52)	1,94 (±0,29)	3,02 (±0,76)	0,006	-1,86 bis 0,39	-3,03 bis -0,6
d₄₋₇	1,46 (±0,38)	2,37 (±0,39)	3,05 (±0,7)	0,0001	-1,57 bis -0,26	-2,38 bis -0,82
GFR-Cyst. (ml/min):						
präop	46,5 (±7,8)	45,7 (±15,5)	52,5 (±27,6)	0,912	-64,4 bis 66,1	-77,4 bis 65,4
t₀	74,6 (±22,9)	59,7 (±14,3)	51,7 (±21,5)	0,0002	4,24 bis 25,5	5,05 bis 40,8
t₂₄	68,6 (±22,2)	47,4 (±12,9)	34,0 (±14,8)	< 0,0001	4,24 bis 25,6	19,7 bis 49,5
t₄₈	32,0 (±7,1)	40,3 (±14,9)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
t₇₂	70,5 (±36,5)	32,8 (±4,7)	19,3 (±7,8)	0,041	-11 bis 86,5	-1,45 bis 104
d₄₋₇	49,8 (±16,7)	25,2 (±5,5)	18,6 (±5,7)	< 0,0001	11,9 bis 37,4	16,1 bis 46,3

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

Nierenparameter	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Harnstoff (mg/dl):						
präop	45,4 (±18,6)	51,3 (±17,3)	56,2 (±33,4)	0,099	-15,6 bis 3,83	-25 bis 3,54
t₀	35,3 (±14,4)	40,5 (±14,3)	48,5 (±23)	0,012	-12,7 bis 2,27	-24,9 bis -1,61
t₂₄	36,9 (±16,3)	48,8 (±20,5)	64,8 (±23)	< 0,0001	-20,6 bis -3,03	-40,6 bis -15,1
t₄₈	40,4 (±19,8)	58,0 (±24,5)	70,2 (±30,9)	< 0,0001	-28,7 bis -6,46	-45,8 bis -13,8
t₇₂	41,0 (±19,5)	65,3 (±27,3)	72,0 (±37,1)	< 0,0001	-36,2 bis -12,3	-47,8 bis -14,1
d₄₋₇	41,2 (±17,3)	73,2 (±30,8)	91,5 (±42,6)	< 0,0001	-43,6 bis -20,3	-67,4 bis -33,2
Urin (t₀):						
Dichte (g/ml)	1,01 (±0,01)	1,01 (±0,01)	1,02 (±0)	0,275	-0,01 bis 0,01	-0,01 bis 0,003
pH	5,72 (±0,76)	5,88 (±1,03)	5,0 (±0)	0,219	-1,37 bis 1,06	-0,49 bis 1,94
Kreatinin (mg/dl)	20,4 (±16,6)	26,9 (±15,5)	28,9 (±16)	0,180	-16,8 bis 3,75	-24,6 bis 7,46
Protein (mg/l)	112 (±113)	163 (±140)	427 (±427)	< 0,0001	-156 bis 55,3	-479 bis -150
Albumin (mg/l)	29,8 (±31,3)	47,8 (±44,9)	198 (±225)	< 0,0001	-63,3 bis 27,4	-239 bis -97,8
α₁-Mikroglob. (mg/l)	23,9 (±28,9)	37,4 (±42,9)	60,6 (±78,2)	0,049	-38,2 bis 11,3	-75,1 bis 1,75
IgG (gesamt) (mg/l)	22,7 (±19,3)	19,0 (±12,4)	90,9 (±78,7)	0,003	-35 bis 42,4	-116 bis -20,6
Osmol. (mosm/kg)	337 (±89,8)	366 (±85,1)	358 (±73,3)	0,417	-86 bis 26,9	-107 bis 65,5

Tabelle 15: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Nierenfunktionsparameter nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils der Wert zu einem Bestimmten Zeitpunkt (präoperativ, bei Ankunft auf Intensivstation, nach 24, 48 und 72 Stunden nach OP), sowie der höchste Wert innerhalb des Zeitraums von vier bis sieben Tagen nach OP. k.A.: keine Angabe. Kreatinin in mg/dl, Cystatin C in mg/l, GFR-Cystatin in ml/min (GFR-Berechnung nach der CKD-EPI-Cystatin-C-Formel), Harnstoff in mg/dl, Urin-Untersuchung bei Ankunft auf Intensivstation der Dichte (g/ml), des pH, des Kreatinins (mg/dl), der Gesamtproteinmenge (mg/l), des Albumins (mg/l), des α₁-Mikroglobulins (mg/l), der IgG-Gesamtmenge (mg/l) und der Osmolalität (Osmol in mosm/kg H₂O). Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

Patienten mit höhergradiger AKI schieden in den ersten 48 Stunden nach der Operation signifikant weniger aus als Patienten ohne AKI: 0,65 ml/kg/h (SD 0,38) innerhalb der ersten 24 h postoperativ vs. 1,59 ml/kg/h (SD 0,68) ($p < 0,0001$) und 0,87 ml/kg/h (SD 0,68) innerhalb der zweiten 24 h postoperativ vs. 1,41 ml/kg/h (SD 0,62) ($p = 0,017$). Die Diurese am dritten postoperativen Tag zeigt zwar in der Varianzanalyse eine Signifikanz, die sich aber für keine der untersuchten Gruppen im Post-Test bestätigen ließ. Am ersten postoperativen Tag erhielten Patienten mit höhergradiger AKI mit 5460 ml (SD 2270) signifikant mehr Kristalloide als Patienten ohne AKI mit 3415 ml (SD 1902) ($p = 0,002$), ebenso am zweiten (1316 ml (SD 1795) vs. 269 ml (SD 1053), $p = 0,012$) und dritten postoperativen Tag (1521 ml (SD 2484) vs. 12 ml (SD 1105), $p < 0,0001$). Patienten mit höhergradiger AKI erhielten intraoperativ mit 77 ml (SD 277) signifikant mehr Gelatine als Patienten ohne AKI mit 0 ml (SD 0) ($p = 0,005$). Am dritten postoperativen Tag zeigt sich ein ähnliches Ergebnis für Patienten mit leichter AKI, die im Durchschnitt 61 ml (SD 166) Gelatine erhielten, verglichen mit Patienten ohne AKI, die nur 5 ml (SD 50) erhielten ($p = 0,007$). Für die Gabe von Hydroxyethylstärke (HES) und Albumin liegen zum Teil nicht genügend Daten vor. Alle Mittelwerte mit Standardabweichung sind in Tabelle 16 angegeben.

Volumenein-/ausfuhr	AKI 0 \pm SD	AKI 1 \pm SD	AKI 2 & 3 \pm SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Diurese (ml/kg/h):						
intraop	3,78 (\pm 3,02)	2,84 (\pm 2,25)	2,14 (\pm 1,69)	0,072	-0,5 bis 2,37	-0,43 bis 3,71
1-24 h postop	1,59 (\pm 0,68)	1,33 (\pm 0,5)	0,65 (\pm 0,38)	< 0,0001	-0,05 bis 0,56	0,49 bis 1,38
25-48 h postop	1,41 (\pm 0,62)	1,43 (\pm 0,72)	0,87 (\pm 0,68)	0,017	-0,34 bis 0,29	0,07 bis 1
49-72 h postop	1,43 (\pm 0,57)	1,75 (\pm 0,77)	1,08 (\pm 1,74)	0,028	-0,72 bis 0,07	-0,23 bis 0,93
Kristalloidbilanz (ml):						
intraop	1352 (\pm 1317)	1787 (\pm 1835)	1325 (\pm 1074)	0,304	-1128 bis 259	-993 bis 1048
1-24 h postop	3415 (\pm 1902)	4168 (\pm 2516)	5460 (\pm 2270)	0,002	-1766 bis 259	-3534 bis -558
25-48 h postop	269 (\pm 1053)	208 (\pm 1410)	1316 (\pm 1795)	0,012	-529 bis 651	-1914 bis -180
49-72 h postop	12 (\pm 1105)	-587 (\pm 1305)	1521 (\pm 2484)	< 0,0001	-51,5 bis 1250	-2520 bis -498

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

Volumenein-/ausfuhr	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
HES (ml):						
intraop	289 (±436)	152 (±293)	2192 (±325)	0,201	-56,4 bis 332	-189 bis 382
1-24 h postop	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k.A.	k.A.	k.A.
25-48 h postop	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k.A.	k.A.	k.A.
49-72 h postop	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k.A.	k.A.	k.A.
Gelatine (ml):						
intraop	0 (±0)	0 (±0)	77 (±277)	0,005	-38,7 bis 38,7	-134 bis -20
1-24 h postop	193 (±346)	303 (±352)	154 (±315)	0,231	-278 bis 57,6	-207 bis 286
25-48 h postop	20 (±120)	76 (±182)	0 (±0)	0,075	-120 bis 7,81	-74,5 bis 114
49-72 h postop	5 (±50)	61 (±166)	0 (±0)	0,007	-98,6 bis -12,7	-58,2 bis 68,1
Albumin (g):						
intraop	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k.A.	k.A.	k.A.
1-24 h postop	1,78 (±8,53)	3,03 (±10,2)	9,23 (±22,5)	0,066	-6,47 bis 3,98	-15,1 bis 0,23
25-48 h postop	0,78 (±7,92)	0,61 (±3,48)	0 (±0)	0,924	-3,13 bis 3,48	-4,07 bis 5,64
49-72 h postop	0 (±0)	0,61 (±3,48)	0 (±0)	0,178	-1,4 bis 0,19	-1,17 bis 1,17

Tabelle 16: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der das Flüssigkeitsvolumen beeinflussenden Merkmale nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils die Summe der Volumina, die intraoperativ (intraop) und innerhalb von drei postoperativen (postop) Zeiträumen abgeführt oder verabreicht wurde. Diurese (Urinausscheidungsmenge) in ml/kg/h, Kristalloidbilanz in ml (Einfuhr minus Ausfuhr aller kristalloider Lösungen), HES: Hydroxyethylstärke in ml, Gelatine in ml, Albumin in g. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.6 Hämodialyse

Im beobachteten Zeitraum (den ersten drei postoperativen Tagen) wurde keiner der Patienten ohne AKI oder mit leichter AKI (AKI 1) dialysiert. Sechs Patienten aus der Gruppe AKI 2 & 3 wurden an eine Dialyse angeschlossen – das entspricht 46,2 % der Patienten mit höhergradiger

Nierenschädigung. Patienten mit AKI wurden mit einer mittels exaktem Fisher-Test errechneten Signifikanz von $p = 0,001$ (OR 0,03, KI 0,002 – 0,55) häufiger dialysiert als Patienten ohne AKI.

3.7 Patientencharakteristika

3.7.1 Geschlecht, Größe, Alter und Gewicht

In der Studienkohorte befinden sich 95 männliche (entspricht 64 %) und 53 weibliche (entspricht 36 %) Patienten (s. Tabelle 17). Die mittels exaktem Fisher-Test errechnete Zuordnung zum Geschlecht beim Vergleich der Patienten mit und ohne AKI ist nicht signifikant ($p = 1,0$, OR 0,94, KI 0,45 – 1,94).

Geschlecht	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3
Männlich	65	22	8
Weiblich	37	11	5

Tabelle 17: Geschlechterverteilung nach AKI-Stadien (absolut)

AKI: acute kidney injury (akute Nierenschädigung). Stadieneinteilung nach KDIGO.

Der Altersmittelwert liegt bei 70,6 Jahren, dabei liegt das Durchschnittsalter in der Gruppe ohne AKI bei 70,1 (SD 10,6), in der Gruppe AKI 1 bei 72,6 (SD 9,9) und in der Gruppe AKI 2 & 3 bei 69,8 (SD 13,0) Jahren. Sowohl bei den Mittelwerten von Alter, Größe, Gewicht als auch dem daraus errechneten Body-Mass-Index (BMI) fallen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen auf (s. Tabelle 18).

Charakteristika	AKI 0 \pm SD	AKI 1 \pm SD	AKI 2 & 3 \pm SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Alter (Jahre)	70,1 (\pm 10,6)	72,6 (\pm 9,9)	69,8 (\pm 13,0)	0,495	-7,61 bis 2,72	-7,24 bis 7,95
Größe (m)	1,72 (\pm 0,09)	1,73 (\pm 0,1)	1,68 (\pm 0,07)	0,292	-0,06 bis 0,03	-0,03 bis 0,1
Gewicht (kg)	81,9 (\pm 17,7)	88,1 (\pm 15,6)	80,8 (\pm 18,7)	0,176	-14,7 bis 2,14	-11,4 bis 13,4
BMI (kg/m ²)	27,5 (\pm 5,33)	28,7 (\pm 6,98)	28,5 (\pm 6,44)	0,538	-4,05 bis 1,61	-5,11 bis 3,2

Tabelle 18: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Patientencharakteristika nach AKI-Stadien

BMI: Body-Mass-Index. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben.

3.7.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen

Da es sich in der Studie um Patienten handelt, die sich einer kardiochirurgischen Operation unterziehen, sind die kardiovaskulären Risikofaktoren und andere bekannte Komorbiditäten von Relevanz. In Tabelle 19 sind die untersuchten Vorerkrankungen aufgelistet. Verglichen wurden in der statistischen Auswertung die Patienten ohne AKI (AKI 0) mit denen, die eine AKI entwickelten (AKI 1, 2 & 3). Für keines der Merkmale zeigen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen.

Charakteristika	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert	OR	KI
Bluthochdruck (%)	75,49	69,70	76,92	0,686	1,21	0,55 bis 2,66
Hypercholesterinämie (%)	42,16	42,42	30,77	0,857	1,13	0,56 bis 2,31
Diabetes mellitus (%)	26,47	39,39	46,15	0,085	0,51	0,25 bis 1,07
Raucher (%)	13,73	18,18	7,69	0,803	0,89	0,33 bis 2,37
Adipositas (BMI > 30kg/m ²) (%)	29,41	42,42	46,15	0,132	0,54	0,26 bis 1,12
Positive Familienanamnese für KHK (%)	12,75	6,06	0,00	0,148	3,21	0,69 bis 14,87
Koronare Herzkrankheit (%)	67,65	57,58	61,54	0,353	1,47	0,72 bis 3,02
Arterielle Verschlusskrankheit (%)	19,61	33,33	23,08	0,205	0,56	0,25 bis 1,24
Z.n. herzchirurgischer OP (%)	8,82	9,09	38,46	0,164	0,46	0,17 bis 1,28
Z.n. interventionellem Eingriff (%)	24,51	18,18	30,77	0,835	1,17	0,51 bis 2,69
Vorhofflimmern (%)	37,25	36,36	46,15	0,856	0,92	0,45 bis 1,89
Herzinsuffizienz (%)	36,27	36,36	46,15	0,854	0,89	0,43 bis 1,81

Tabelle 19: Untersuchte Vorerkrankungen, p-Werte und Odd's Ratios nach AKI-Stadien

Angegeben sind die prozentual Erkrankten im jeweiligen AKI-Stadium mit der ausgewerteten Vorerkrankung. BMI: Body-Mass-Index, KHK: koronare Herzkrankheit, Z.n.: Zustand nach. Interventionelle Eingriffe am Herzen umfassen bspw. minimalinvasive Implantationen einer Herzklappe über die Leistengefäße. Die p-Werte wurden mittels exaktem Fisher-Test errechnet und mit Odd's Ratio (OR) und 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

3.7.3 Präoperative Merkmale

Vor jeder kardiochirurgischen Operation sollte echokardiographisch die links- und rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) des Herzens bestimmt werden. EF-Werte zwischen 53 % und 73 % werden als normal erachtet [89]. Die Pumpfunktion zeigte in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne AKI.

Der STS-Score zeigt bei der Voraussage der Mortalität, des Risikos für AKI und des Risikos für einen Schlaganfall signifikant höhere Werte bei Patienten mit AKI 2 & 3 als bei Patienten ohne oder mit leichter AKI. Auch der Cleveland Clinic Score fällt als Risiko-Score für die Entstehung einer dialysepflichtigen AKI signifikant höher bei Patienten mit höhergradiger AKI aus als bei Patienten ohne AKI.

Die Mittelwerte der prächirurgisch gemessenen Merkmale und errechneten Scores sind in Tabelle 20 angegeben.

Charakteristika	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
LVEF (%)	54,2 (±11,1)	51,4 (±12,0)	47,5 (±13,3)	0,106	-2,97 bis 8,45	-1,58 bis 14,8
RVEF (%)	59,2 (±4,11)	59,9 (±3,39)	59,6 (±1,39)	0,689	-2,55 bis 1,24	-3,12 bis 2,32
STS: Sterberisiko (%)	2,55 (±1,97)	3,71 (±3,0)	6,21 (±4,61)	< 0,0001	-2,41 bis 0,1	-5,47 bis -1,85
STS: Risiko für AKI (%)	5,02 (±4,36)	6,8 (±3,46)	11,5 (±7,66)	< 0,0001	-4,05 bis 0,49	-9,70 bis -3,18
STS: Risiko für Schlaganfall (%)	1,65 (±0,96)	2,06 (±1,35)	2,73 (±1,53)	0,003	-0,95 bis 0,15	-1,87 bis -0,29
Cleveland Clinic Score: dialysepflichtige AKI (%)	1,41 (±1,79)	1,48 (±0,6)	1,68 (±0,4)	0,005	entfällt	entfällt

Tabelle 20: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der prächirurgisch erfassten Herzfunktion und Risikotests nach AKI-Stadien

Bestimmt wurden die präoperative links- und rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion des Herzens (LVEF und RVEF), sowie der STS- (Society of Thoracic Surgeons) und Cleveland Clinic Score. AKI: acute kidney Injury (akute Nierenschädigung). Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden für fast alle Charakteristika nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Lediglich für den Cleveland Clinic Score wurde aufgrund einer nicht-parametrischen Verteilung der Werte ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von AKI 0 mit AKI 1 und von AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.8 Art und Dauer der Operation

Insgesamt waren 141 der durchgeführten Eingriffe elektiv, drei hatten einen dringlichen Status und vier zählten als Notfalleingriff.

Die durchgeführten kardiochirurgischen Operationen reichten von Klappen- und/ oder Bypass-, zu Ascendens- und/ oder Aortenbogenersatz-Operationen mit oder ohne Übernahme der Kreislauffunktion durch eine Herz-Lungen-Maschine (HLM). Am häufigsten wurde der CABG (*Coronary Artery Bypass Grafting*, Koronararterienbypass) (bei 54 Patienten) und der Aortenklappenersatz (bei 40 Patienten) durchgeführt. 51 Patienten erhielten eine isolierte Bypass-, 60 eine isolierte Klappen-, 34 eine kombinierte Bypass-Klappen-Operation und 3 einen isolierten (Teil-)Bogenersatz. Eine Übersicht über die durchgeführten Operationen bietet Abb. 11.

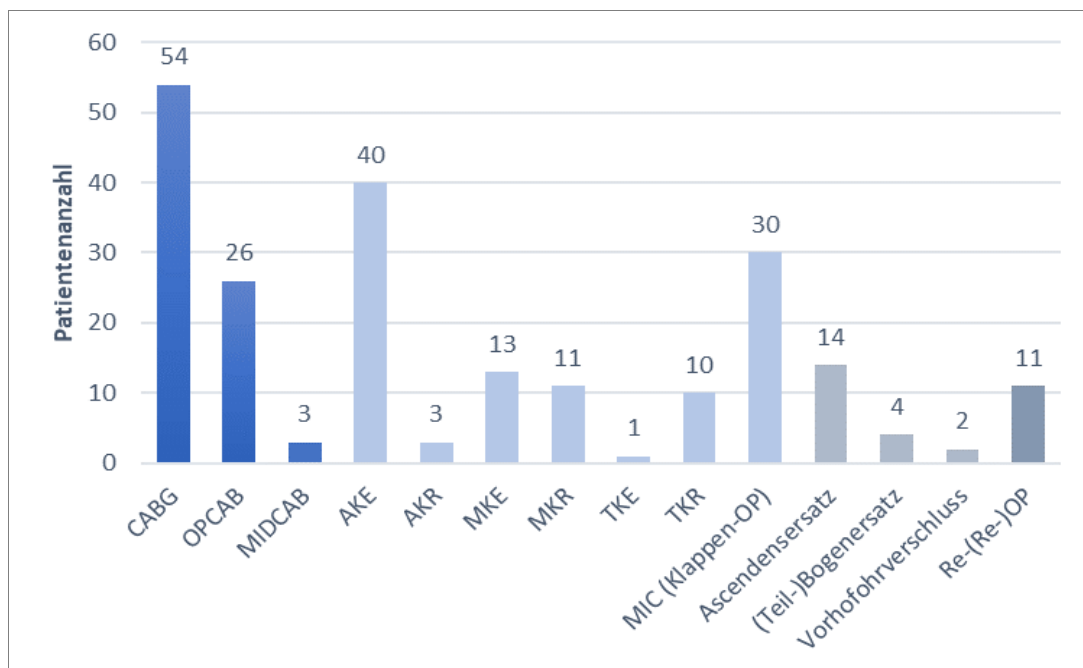


Abb. 11: Übersicht der durchgeführten Operationen

Angabe der absoluten Patientenzahlen auf der y-Achse und der OP-Arten auf der x-Achse. Da manche OP-Arten zum Teil kombiniert durchgeführt wurden, ist die Summe der Patientenzahlen höher als die Zahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten. CABG: *Coronary Artery Bypass Grafting* (deutsch: Koronararterienbypass), OPCAB: *Off-Pump-Coronary-Artery-Bypass* (Koronararterienbypass ohne Herz-Lungen-Maschine), MIDCAB: *Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass* (minimalinvasiver Koronararterienbypass), AKE/R: Aortenklappenersatz/ -rekonstruktion, MKE/R: Mitralklappenersatz/ -rekonstruktion, TKE/R: Trikuspidalklappenersatz/ -rekonstruktion, MIC: minimalinvasive Chirurgie an einer Klappe (Ersatz oder Rekonstruktion), Ascendensersatz: Ersatz der Aorta ascendens, (Teil-) Bogenersatz: (Teil-) Ersatz des Aortenbogens, Re- (Re-) OP: Operation nach mind. einer stattgehabten Herz-OP.

Die durchschnittliche Dauer einer Operation betrug 246,6 Minuten, wobei die kürzeste Operation 102 und die längste 622 Minuten andauerte. Die Dauer der Operation zeigt in der Varianzanalyse eine Signifikanz an, die sich jedoch für keine der untersuchten Gruppen im Post-Test bestätigen ließ. Von allen eingeschlossenen Patienten wurden 123 offenchirurgisch am Herzen operiert und 119 unter Einsatz einer HLM. Abb. 12 zeigt die Zuordnung der Patienten zu einer der vier oben genannten OP-Gruppen (isolierte Klappen-/ Bypass-/ (Teil-)Bogenersatz-OP/ kombinierte OP) und bietet eine Übersicht über die Invasivität und Nutzung einer HLM während der OP. Die durchschnittliche Dauer der Nutzung der HLM betrug 118,6 Minuten, wobei die Dauer der Aortenklemmzeit durchschnittlich 70,6 Minuten betrug. Die Aorta wird erst nachdem die HLM angeschlossen wurde abgeklemmt, um den Patientenkreislauf so kurz wie möglich von der HLM übernehmen zu lassen. Die Dauer der Nutzung der HLM (ECC, *extracorporeal circulation*) ist bei Patienten mit AKI 2 & 3 signifikant länger im Vergleich zu Patienten ohne AKI. Bei vier Patienten trat während der Operation ein Kreislaufstillstand von wenigen bis zu 20 Minuten ein. In Tabelle 21 sind die Mittelwerte der verschiedenen OP-Zeiten aufgelistet.

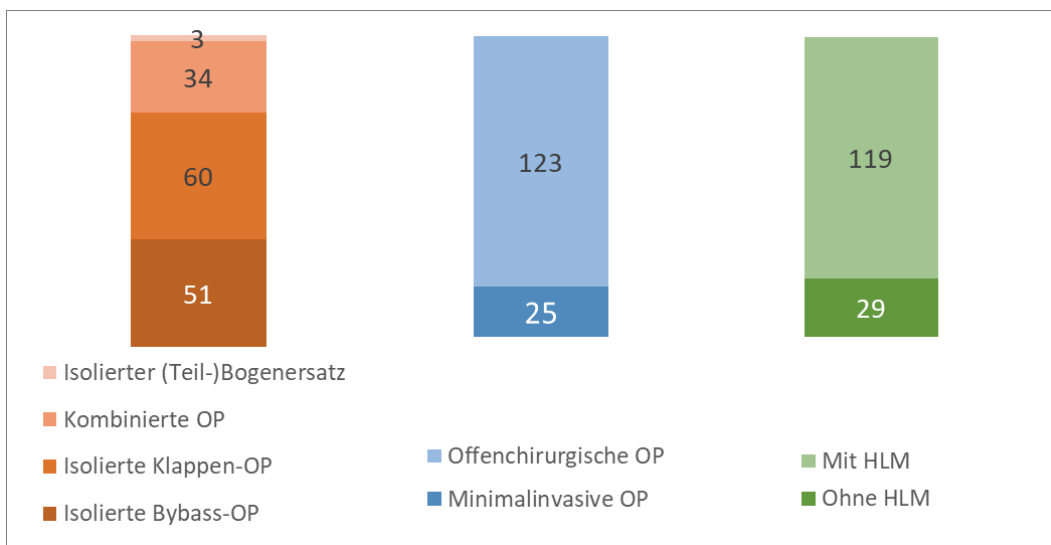


Abb. 12: OP-Gruppe, Invasivität und Nutzung einer HLM

Angegeben sind die absoluten Zahlen. HLM = Herz-Lungen-Maschine.

Charakteristika	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
OP-Dauer (min)	237 (±59,1)	263 (±85,3)	287 (±130)	0,027	-62,1 bis 8,72	-103 bis 2,65
ECC-Dauer (min)	109 (±70,8)	129 (±93,9)	177 (±75,7)	0,009	-56,9 bis 17,0	-124 bis -13,7
Aortenklemmzeit (min)	67,5 (±46,4)	70,8 (±49,6)	94,3 (±41,9)	0,154	-26 bis 19,4	-60,2 bis 6,55
Kreislaufstillstand (min)	0,16 (±1,58)	0,91 (±3,71)	0 (±0)	0,202	-1,81 bis 0,31	-1,4 bis 1,72

Tabelle 21: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der OP-Zeiten nach AKI-Stadien

Alle Zeiten sind in Minuten angegeben. ECC: extracorporeal circulation (Dauer der Nutzung der Herz-Lungen-Maschine). Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

Ob die Chirurgie mit oder ohne extrakorporale Unterstützung (mittels HLM) stattfand, zeigte im exakten Fisher-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne AKI ($p = 0,661$, OR 0,77, KI 0,31 – 1,88). Es wurde auch die Art der genutzten Kardioplegie-Methode erfasst: weder für die Bretschneider-Lösung ($p = 0,239$, OR 0,54, KI 0,2 – 1,46), noch für die Calafiore-Plegie ($p = 0,801$, OR 0,8, KI 0,29 – 2,23) gab es signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne AKI. In der statistischen Auswertung wurden dabei die Patienten ohne AKI (AKI 0) jeweils mit denen, die eine AKI entwickelten (AKI 1, 2 & 3), verglichen.

3.9 Laborchemische Parameter

3.9.1 Infektionsparameter

Die Leukozyten-Zahl ist zu allen vier Zeitpunkten signifikant höher bei Patienten mit AKI als bei Patienten ohne AKI (s. Tabelle 22).

Intraoperativ war die gemessene Körpertemperatur mit 37,1 °C (SD 0,57) signifikant höher bei Patienten mit leichter AKI als bei Patienten ohne AKI mit 36,8 °C (SD 0,46) ($p = 0,004$). Am dritten postoperativen Tag hingegen war die Körpertemperatur bei Patienten mit höhergradiger AKI mit 37,1 °C (SD 0,74) signifikant niedriger als bei Patienten ohne AKI mit 37,7 °C (SD 0,51) ($p = 0,0006$).

Das C-reaktive Protein (CRP) ist am ersten (11,1 mg/dl (SD 5,92) bei AKI 2 & 3 vs. 7,43 mg/dl (SD 4,37) bei AKI 0, $p = 0,005$) und dritten postoperativen Tag (21,6 mg/dl (SD 8,09) bei AKI 1 vs.

17,4 mg/dl (SD 6,94) bei AKI 0, p = 0,022) signifikant höher bei Patienten mit AKI als bei Patienten ohne AKI.

Auch Procalcitonin (PCT) ist zu allen postoperativen Zeitpunkten signifikant höher bei Patienten mit höhergradiger AKI als bei Patienten ohne (bspw. 38,7 ng/ml (SD 39,6) bei AKI 2 & 3 vs. 3,3 ng/ml (SD 5,11) bei AKI 0 am ersten postoperativen Tag, p = 0,0004).

Der SOFA-Score (*sepsis-related organ failure assessment score*) wurde präoperativ und zu oben genannten drei postoperativen Zeitpunkten ausgerechnet und zeigt sich zu all diesen Zeitpunkten signifikant erhöht bei AKI-Patienten. Bspw. beträgt er am ersten postoperativen Tag 13,4 Punkte (SD 3,15) bei AKI 2 & 3 und 11,7 Punkte (SD 2,17) bei AKI 0 (p = 0,0075).

Infektionsparameter	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Leukozyten (x1000/µl):						
intraop	10,1 (±4,57)	12,7 (±5,62)	15,4 (±6,43)	0,0005	-4,96 bis -0,13	-8,94 bis -1,57
1-24 h postop	10,3 (±3,14)	12,3 (±4,05)	15,8 (±5,34)	< 0,0001	-3,71 bis -0,23	-7,09 bis -1,98
25-48 h postop	10,9 (±3,3)	13,3 (±4,1)	14,5 (±6,64)	0,0003	-4,3 bis -0,55	-6,35 bis -0,84
49-72 h postop	10,3 (±3,21)	12,0 (±3,38)	15,7 (±6,57)	< 0,0001	-3,55 bis 0,05	-8,04 bis -2,82
Temperatur (°C):						
intraop	36,8 (±0,46)	37,1 (±0,57)	36,9 (±0,72)	0,004	-0,61 bis -0,1	-0,51 bis 0,22
1-24 h postop	37,8 (±0,59)	37,6 (±0,67)	37,5 (±1,06)	0,243	-0,16 bis 0,49	-0,21 bis 0,73
25-48 h postop	37,7 (±0,49)	37,9 (±0,74)	37,5 (±1,15)	0,227	-0,5 bis 0,12	-0,33 bis 0,57
49-72 h postop	37,7 (±0,51)	37,8 (±0,54)	37,1 (±0,74)	0,0006	-0,36 bis 0,18	0,2 bis 0,97
CRP (mg/dl):						
intraop	0,99 (±2,1)	1,35 (±1,94)	2,71 (±2,38)	0,055	-1,58 bis 0,86	-3,44 bis 0,004
1-24 h postop	7,43 (±4,37)	9,84 (±5,37)	11,1 (±5,92)	0,005	-4,79 bis -0,01	-7,09 bis -0,32
25-48 h postop	18,7 (±6,65)	20,9 (±7,47)	20,7 (±9,35)	0,247	-5,65 bis 1,29	-7,10 bis 3,07
49-72 h postop	17,4 (±6,94)	21,6 (±8,09)	19,8 (±10,3)	0,022	-7,96 bis -0,47	-7,82 bis 3,02

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

PCT (ng/ml):						
intraop	0,07 (±0,09)	0,16 (±0,12)	0,32 (±0,29)	0,077	-0,29 bis 0,13	-0,51 bis 0,03
1-24 h postop	3,3 (±5,11)	8,54 (±8,39)	38,7 (±39,6)	0,0004	-24,6 bis 14,1	-56,3 bis -14,5
25-48 h postop	2,62 (±4,13)	7,44 (±6,9)	45,4 (±40,4)	< 0,0001	-20,6 bis 11	-62 bis -23,6
49-72 h postop	2,08 (±1,95)	5,72 (±4,75)	42,4 (±33,5)	< 0,0001	-20,6 bis 13,3	-59,3 bis -21,3
SOFA-Score:						
präop	0,5 (±0,59)	0,9 (±0,55)	1,3 (±1,32)	0,0001	-0,68 bis -0,03	-1,26 bis -0,3
1-24 h postop	11,7 (±2,17)	12,7 (±1,93)	13,4 (±3,15)	0,0075	-2,07 bis 0,09	-3,29 bis -0,13
25-48 h postop	5,1 (±3,05)	8,9 (±4,59)	12,6 (±4,89)	< 0,0001	-5,53 bis -2,02	-10,1 bis -4,89
49-72 h postop	3,5 (±2,69)	6,5 (±4,1)	10,9 (±4,33)	< 0,0001	-4,53 bis -1,41	-9,74 bis -5,15

Tabelle 22: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Infektionsparameter nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils der höchste Wert, der intraoperativ (intraop) und innerhalb von drei postoperativen (postop) Zeiträumen gemessen wurde. Leukos: Leukozyten in $\times 1000/\mu\text{l}$, Temperatur in $^{\circ}\text{C}$, CRP: C-reaktives Protein in mg/dl, PCT: Procalcitonin in ng/ml, SOFA-Score: sepsis-related organ failure assessment score (Score zur Beurteilung eines Organversagens bei Sepsis) mit minimal 0 und maximal 24 Punkten. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.9.2 Leberwerte

Bilirubin ist in den ersten drei postoperativen Tagen signifikant höher bei Patienten mit höhergradiger AKI als bei Patienten ohne (bspw. 3,13 mg/dl (SD 2,89) bei AKI 2 & 3 vs. 1,47 mg/dl (SD 1,43) bei AKI 0 am ersten postoperativen Tag, $p = 0,002$).

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) zeigt sich ebenfalls zu allen drei postoperativen Zeitpunkten signifikant höher bei Patienten mit AKI (bspw. 107 U/l (SD 81) bei AKI 2 & 3 vs. 77 U/l (SD 39) bei AKI 0 am ersten postoperativen Tag, $p = 0,049$).

Eine detaillierte Übersicht aller Leberwerte findet sich in Tabelle 23.

Leberwerte	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Bilirubin (mg/dl):						
Präop	0,9 (±2,78)	0,51 (±0,27)	0,63 (±0,51)	0,729	-0,84 bis 1,62	-1,55 bis 2,07
1-24 h postop	1,47 (±1,43)	1,28 (±0,86)	3,13 (±2,89)	0,002	-0,64 bis 1,01	-2,85 bis -0,49
25-48 h postop	1,22 (±1,34)	1,66 (±1,08)	3,49 (±2,98)	0,001	-1,48 bis 0,6	-3,64 bis -0,9
49-72 h postop	1,31 (±1,68)	1,54 (±1,53)	3,09 (±3,48)	0,045	-1,77 bis 1,3	-3,52 bis -0,05
AST (U/l):						
1-24 h postop	77 (±39)	147 (±289)	107 (±81)	0,049	-138 bis -1,18	-130 bis 71,4
25-48 h postop	66 (±34)	132 (±184)	139 (±142)	0,002	-119 bis -13,4	-145 bis -0,3
49-72 h postop	45 (±28)	92 (±99)	132 (±153)	< 0,0001	-86,7 bis -8,01	-138 bis -35,5

Tabelle 23: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Leberwerte nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils der höchste Wert, der präoperativ (präop) und/ oder innerhalb von drei postoperativen (postop) Zeiträumen gemessen wurde. Bilirubin in mg/dl, AST: Aspartat-Aminotransferase in U/l. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.9.3 Elektrolyte

Am zweiten und dritten postoperativen Tag zeigen sich Natrium (Na⁺) und Kalium (K⁺) bei Patienten mit AKI signifikant höher als bei Patienten ohne AKI (bspw. 5,48 mmol/l (SD 0,57) für K⁺ bei AKI 2 & 3 vs. 4,94 mmol/l (SD 0,31) bei AKI 0 am zweiten postoperativen Tag, p < 0,0001). Die vollständigen Werte sind Tabelle 24 zu entnehmen. Calcium (Ca²⁺) zeigt am ersten postoperativen Tag eine Signifikanz, die sich im Post-Test allerdings für keine der untersuchten Gruppen bestätigen ließ. Am zweiten und dritten postoperativen Tag sind die Ca²⁺-Werte signifikant niedriger bei Patienten mit AKI als bei Patienten ohne (bspw. 1,09 mmol/l (SD 0,07) bei AKI 2 & 3 vs. 1,14 mmol/l (SD 0,05) bei AKI 0 am zweiten postoperativen Tag, p = 0,005). Die postoperative Basenabweichung (engl. *Base Excess*, BE) ist signifikant negativer am ersten und zweiten postoperativen Tag bei Patienten mit AKI 2 & 3 (bspw. -5,08 mmol/l (SD 3,19) am ersten postoperativen Tag) verglichen mit Patienten ohne AKI (-1,86 mmol/l (SD 2,33) am ersten postoperativen Tag, p = 0,0002) sowie signifikant positiver am dritten postoperativen Tag bei

Patienten mit AKI 1 mit 2,28 mmol/l (SD 3,32) verglichen mit Patienten ohne AKI mit 0,6 mmol/l (SD 2,63) ($p = 0,0008$). Das Laktat ist zu allen untersuchten Zeitpunkten (intraoperativ, am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag) signifikant höher bei Patienten mit AKI (bspw. intraoperativ 3,68 mmol/l (SD 2,91) bei AKI 2 & 3 vs. 1,8 mmol/l (SD 0,91) bei AKI 0, $p < 0,0001$). Die weiteren Werte sind Tabelle 24 zu entnehmen. Der pH-Wert ist intraoperativ mit 7,25 (SD 0,12) signifikant niedriger bei Patienten mit höhergradiger AKI als bei Patienten ohne AKI mit 7,31 (SD 0,06) ($p = 0,003$). Auch am dritten postoperativen Tag ist der pH-Wert mit 7,37 (SD 0,05) bei AKI 2 & 3 signifikant niedriger als bei Patienten ohne AKI mit 7,41 (SD 0,04) ($p = 0,02$). Am ersten postoperativen Tag zeigte sich für den pH auch eine Signifikanz, die sich allerdings für keine der untersuchten Gruppen im Post-Test bestätigen ließ.

In Tabelle 24 stehen die vollständigen Werte aller erfassten Elektrolyte.

Elektrolyte	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
Na⁺ (mmol/l):						
intraop	132 (±6,8)	132 (±8,4)	128 (±7,5)	0,23	-3,2 bis 3,85	-1,55 bis 9,19
1-24 h postop	136 (±3,4)	137 (±3,6)	137 (±3,3)	0,636	-2,29 bis 1,07	-2,99 bis 1,96
25-48 h postop	135 (±3,5)	138 (±2,8)	139 (±4,7)	< 0,0001	-4,98 bis -1,59	-7,14 bis -2,14
49-72 h postop	134 (±3,9)	138 (±2,9)	138 (±5,5)	< 0,0001	-6,08 bis -2,26	-7,25 bis -1,74
K⁺ (mmol/l):						
intraop	5,42 (±0,63)	5,42 (±0,52)	5,4 (±0,77)	0,999	-0,31 bis 0,3	-0,46 bis 0,46
1-24 h postop	5,255 (±0,36)	5,34 (±0,376)	5,37 (±0,36)	0,274	-0,27 bis 0,08	-0,38 bis 0,13
25-48 h postop	4,94 (±0,31)	5,22 (±0,53)	5,48 (±0,57)	< 0,0001	-0,48 bis -0,1	-0,83 bis -0,27
49-72 h postop	4,97 (±0,23)	4,93 (±0,25)	5,31 (±0,52)	< 0,0001	-0,1 bis 0,17	-0,54 bis -0,15
Ca²⁺ (mmol/l):						
intraop	1,13 (±0,07)	1,12 (±0,09)	1,09 (±0,1)	0,282	-0,03 bis 0,05	-0,02 bis 0,1
1-24 h postop	1,17 (±0,08)	1,2 (±0,07)	1,2 (±0,11)	0,034	-0,07 bis 0,01	-0,1 bis 0,01
25-48 h postop	1,14 (±0,05)	1,14 (±0,05)	1,09 (±0,07)	0,005	-0,02 bis 0,03	0,01 bis 0,09
49-72 h postop	1,14 (±0,05)	1,13 (±0,05)	1,1 (±0,06)	0,034	-0,02 bis 0,04	0,003 bis 0,08

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

BE (mmol/l):						
intraop	-4,19 (±2,57)	-5,26 (±3,4)	-5,7 (±6,55)	0,116	-0,5 bis 2,64	-0,88 bis 3,91
1-24 h postop	-1,86 (±2,33)	-3,02 (±3,6)	-5,08 (±3,19)	0,0002	-0,17 bis 2,49	1,26 bis 5,17
25-48 h postop	0,09 (±2,71)	1,0 (±3,48)	-2,13 (±3,57)	0,007	-2,35 bis 0,53	0,1 bis 4,34
49-72 h postop	0,6 (±2,63)	2,28 (±3,32)	-1,33 (±4,29)	0,0008	-3,16 bis -0,2	-0,21 bis 4,08
pH (mmHg):						
intraop	7,31 (±0,06)	7,29 (±0,07)	7,25 (±0,12)	0,003	-0,01 bis 0,06	0,02 bis 0,12
1-24 h postop	7,32 (±0,05)	7,3 (±0,06)	7,29 (±0,05)	0,042	-0,01 bis 0,04	-0,004 bis 0,07
25-48 h postop	7,38 (±0,05)	7,38 (±0,03)	7,35 (±0,08)	0,079	-0,02 bis 0,02	-0,002 bis 0,06
49-72 h postop	7,41 (±0,04)	7,41 (±0,04)	7,37 (±0,05)	0,02	-0,03 bis 0,02	0,003 bis 0,06
Laktat (mmol/l):						
intraop	1,8 (±0,91)	2,81 (±2,01)	3,68 (±2,91)	< 0,0001	-1,72 bis -0,3	-2,96 bis -0,81
1-24 h postop	2,36 (±1,43)	5,13 (±4,76)	6,1 (±4,15)	< 0,0001	-4,13 bis -1,41	-5,74 bis -1,74
25-48 h postop	1,78 (±0,83)	2,82 (±1,96)	3,52 (±2,25)	< 0,0001	-1,68 bis -0,4	-2,69 bis -0,81
49-72 h postop	1,65 (±0,9)	1,87 (±1,04)	2,93 (±1,76)	0,0003	-0,73 bis 0,31	-2,02 bis -0,53

Tabelle 24: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Elektrolyte nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils der niedrigste Wert, der intraoperativ (intraop) und innerhalb von drei postoperativen (postop) Zeiträumen gemessen wurde, mit Ausnahme des Kaliums und Laktats, bei denen der jeweils höchste Wert erfasst wurde. Na⁺: Natrium in mmol/l, K⁺: Kalium in mmol/l, Ca²⁺: Calcium in mmol/l, BE: Base Excess in mmol/l, Laktat in mg/dl. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.9.4 Beatmung

Bei der intraoperativen Beatmung von Patienten zeigen sich signifikant niedrigere arterielle Sauerstoffpartialdrücke (paO₂) bei Patienten mit leichter AKI (157 mmHg, SD 81) im Vergleich mit Patienten ohne AKI (206 mmHg, SD 75) (p = 0,004). Analog ist die arterielle Sauerstoffsättigung (SaO₂) mit 97,2 mmHg (SD 2) signifikant niedriger bei Patienten mit AKI 1 als bei Patienten ohne AKI mit 98,5 mmHg (SD 2) (p = 0,002). Rechnet man anhand dieser Werte den

Horowitz-Quotienten (paO_2/FiO_2) als Maß für die Oxygenierung aus, erhält man 219 mmHg für die Gruppe ohne AKI, 167 mmHg für Patienten mit AKI 1 und 176 mmHg für Patienten mit AKI 2 & 3.

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$) ist am ersten postoperativen Tag bei Patienten mit leichter AKI mit 36 mmHg (SD 4) signifikant höher als bei Patienten ohne AKI mit 33,7 mmHg (SD 5) ($p = 0,043$).

Die inspiratorische Sauerstoff-Fraktion (FiO_2) ist in den ersten drei postoperativen Tagen signifikant höher bei Patienten mit AKI verglichen mit Patienten ohne AKI (bspw. 0,74 (SD 0,09) bei AKI 1 vs. 0,7 (SD 0,07) bei AKI 0 am ersten postoperativen Tag, $p = 0,035$). Die restlichen Werte können Tabelle 25 entnommen werden. Bereits intraoperativ zeigt sich eine Signifikanz, die sich allerdings im Post-Test für keine der untersuchten Gruppen bestätigen ließ.

Bei Ankunft auf der Intensivstation (t_0) ist die alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz ($AaDO_2$) mit 405 mmHg (SD 74) bei Patienten mit leichter AKI signifikant höher als bei Patienten ohne AKI mit 372 mmHg (SD 49) ($p = 0,02$).

Die totale Beatmungsdauer ist bei Patienten mit AKI (bspw. 256 h (SD 305) bei AKI 2 & 3) signifikant länger als bei Patienten ohne AKI (23,5 h, SD 43,6, $p < 0,0001$).

Beatmungsmerkmale	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
paO₂ (mmHg):						
intraop	206 (±75)	157 (±81)	168 (±63)	0,004	11,9 bis 84,8	-18,2 bis 93
1-24 h postop	82,7 (±15)	75,2 (±22)	75,7 (±17)	0,051	-0,65 bis 15,8	-5,06 bis 19,1
25-48 h postop	73,2 (±12)	68,9 (±11)	75,4 (±15)	0,121	-1,35 bis 10	-10,5 bis 6,25
49-72 h postop	75,5 (±14)	71,9 (±14)	78 (±12)	0,31	-3,37 bis 10,6	-12,3 bis 7,24
paCO₂ (mmHg):						
intraop	34,6 (±4)	34,9 (±4)	33,3 (±3)	0,484	-2,31 bis 1,67	-1,7 bis 4,37
1-24 h postop	33,7 (±5)	36 (±4)	34 (±4)	0,043	-4,45 bis -0,09	-3,42 bis 2,98
25-48 h postop	37,5 (±5)	37,2 (±5)	33,7 (±6)	0,059	-2,26 bis 2,85	-0,04 bis 7,48
49-72 h postop	36 (±5)	36,2 (±5)	34 (±5)	0,424	-2,89 bis 2,55	-1,84 bis 5,77

(Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite)

SaO₂ (mmHg):						
intraop	98,5 (±2)	97,2 (±2)	97,5 (±2)	0,002	0,38 bis 2,18	-0,3 bis 2,36
1-24 h postop	94,6 (±4)	93,5 (±5)	94,5 (±2)	0,352	-0,76 bis 2,98	-2,66 bis 2,84
25-48 h postop	93,6 (±9)	93,8 (±3)	92,9 (±7)	0,943	-4,12 bis 3,63	-5,04 bis 6,35
49-72 h postop	95 (±2)	94,2 (±3)	95,8 (±1)	0,115	-0,42 bis 2	-2,42 bis 0,96
FiO₂:						
intraop	0,94 (±0,02)	0,94 (±0,03)	0,95 (±0,03)	0,044	-0,02 bis 0,004	-0,03 bis 0,002
1-24 h postop	0,7 (±0,07)	0,74 (±0,09)	0,71 (±0,1)	0,035	-0,08 bis -0,003	-0,06 bis 0,04
25-48 h postop	0,26 (±0,13)	0,65 (±0,21)	0,66 (±0,19)	< 0,0001	-0,49 bis -0,3	-0,52 bis -0,29
49-72 h postop	0,24 (±0,12)	0,6 (±0,19)	0,61 (±0,17)	< 0,0001	-0,45 bis -0,27	-0,48 bis -0,26
AaDO₂ (mmHg) (t₀)						
	372 (±49)	405 (±74)	386 (±78)	0,02	-60,7 bis -4,49	-55,6 bis 27,1
Beatmungsstunden total						
	23,5 (±43,6)	122 (±226)	256 (±305)	< 0,0001	-168 bis -29,7	-334 bis -131

Tabelle 25: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Beatmungsmerkmale nach AKI-Stadien

Angegeben ist jeweils der niedrigste Wert, der intraoperativ (intraop) und innerhalb von drei postoperativen (postop) Zeiträumen gemessen wurde, mit Ausnahme der FiO₂, bei der der jeweils höchste Wert erfasst wurde. paO₂: arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg, paCO₂: arterieller Kohlendioxidpartialdruck in mmHg, SaO₂: arterielle Sauerstoffsättigung in mmHg, FiO₂: inspiratorische Sauerstoff-Fraktion, AF: Atemfrequenz (Atemzüge pro Minute) bei Ankunft auf Intensivstation, AaDO₂: Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz in mmHg bei Ankunft auf Intensivstation, Summe der intra- und postoperativen Beatmungsstunden vor Extubation. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

3.10 Überlebenswahrscheinlichkeit und Mortalität

Der APACHE II Score als Prädiktor der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten auf Intensivstationen betrug bei Ankunft auf der Intensivstation in der Gruppe ohne AKI im Mittelwert 26,5 (SD 3,23), in der Gruppe mit leichter AKI 29 (SD 3,85) und in der Gruppe mit höhergradiger AKI 29,5 (SD 4,16). Der Score ist bei AKI-Patienten laut one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen (p = 0,0001; KI AKI 0 vs. AKI 1: -4,21 – -0,85 und KI AKI 0 vs. AKI 2 & 3: -5,46 – -0,53).

In der Gruppe ohne AKI starb ein Patient (entspricht 0,98 % der AKI 0-Patienten), in der Gruppe mit leichter AKI starben vier Patienten (entspricht 12,1 % der AKI 1-Patienten) und in der Gruppe mit höhergradiger AKI starben drei (entspricht 23,1 % der AKI 2 & 3-Patienten) (s. Abb. 13). Die Mortalität in der MiRAKI-Studie beträgt für Patienten ohne AKI 0,68 % und für Patienten mit AKI 4,8 %. Die mittels exaktem Fisher-Test errechnete Wahrscheinlichkeit während des Klinikaufenthaltes zu sterben ist für Patienten mit AKI signifikant höher als für Patienten ohne AKI ($p = 0,001$, OR 18,1, KI 2,16 – 152).

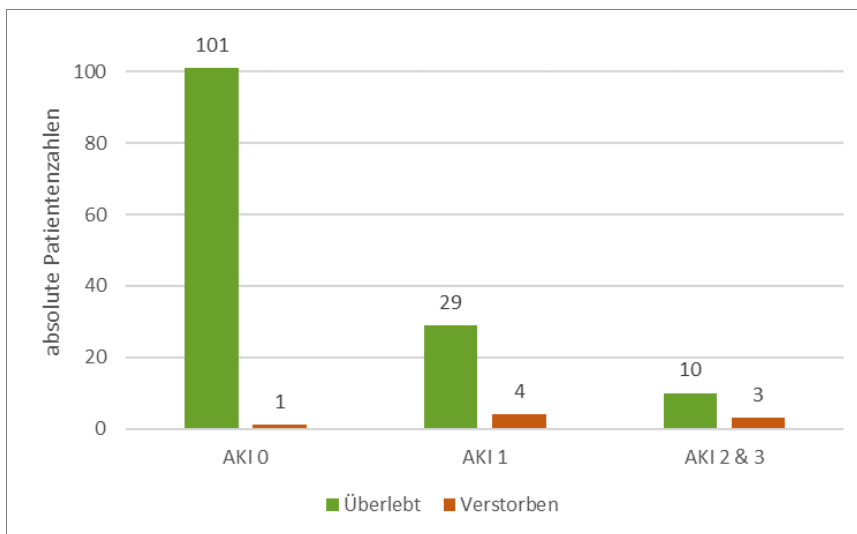


Abb. 13: Mortalität nach AKI-Schweregradeinteilung

Angegeben sind die absoluten Zahlen in der jeweiligen Gruppe. Die grünen Balken stellen die Überlebenden und die roten die Verstorbenen dar. AKI = acute kidney injury (akute Nierenschädigung).

3.11 Entlassungsmerkmale

Zu den erfassten Merkmalen bei Entlassung zählen die auf Intensivstation und die insgesamt in der Klinik verbrachten Tage. Da manche Patienten nicht nur unmittelbar postoperativ, sondern aufgrund von Komplikationen ein weiteres Mal auf Intensivstation verlegt werden mussten, wurde die Tagesanzahl in dieser Kategorie getrennt betrachtet. Die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation (unmittelbar nach OP, sowie insgesamt) und die Klinikaufenthaltsdauer sind bei allen Patienten mit AKI signifikant länger als bei Patienten ohne AKI (bspw. beträgt die Intensivstationsaufenthaltsdauer nach OP 16,4 Tage (SD 14,7) bei AKI 2 & 3 vs. 2,3 Tage (SD 3,2) bei AKI 0, $p < 0,0001$). Die restlichen Werte sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Der letzte Kreatininwert vor Entlassung ist bei Patienten mit AKI (bspw. 1,74 mg/dl (SD 0,81) bei AKI 2 & 3) signifikant höher als bei Patienten ohne AKI (1,09 mg/dl (SD 0,29), $p < 0,0001$).

Entlassungsmerkmale	AKI 0 ± SD	AKI 1 ± SD	AKI 2 & 3 ± SD	p-Wert	KI 0 vs. 1	KI 0 vs. 2 & 3
ICU-Tage nach OP	2,3 (±3,2)	8,29 (±10,5)	16,4 (±14,7)	< 0,0001	-9,35 bis -2,62	-19,2 bis -8,98
ICU-Tage total	2,6 (±4,4)	10,1 (±14)	17,7 (±14,3)	< 0,0001	-11,6 bis -3,34	-21,4 bis -8,76
Klinikaufenthaltstage	17,2 (±10)	24,9 (±21,1)	38,3 (±21,7)	< 0,0001	-14,7 bis -0,77	-31,6 bis -10,5
Kreatinin (letzter) (mg/dl)	1,09 (±0,29)	1,51 (±0,47)	1,74 (±0,81)	< 0,0001	-0,61 bis -0,23	-0,95 bis -0,36

Tabelle 26: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Merkmale bei Entlassung nach AKI-Stadien

Angegeben sind die Tage, die postoperativ auf der Intensivstation verbracht wurden (ICU: intensive care unit, Intensivstation), sowie die Tage, die insgesamt während des Klinikaufenthalts auf Intensivstation und insgesamt in der Klinik verbracht wurden. Zuletzt bestimmter Kreatininwert vor Entlassung in mg/dl. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test errechnet. Die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sind für den Vergleich von Gruppe AKI 0 mit AKI 1 und von Gruppe AKI 0 mit AKI 2 & 3 angegeben. Signifikante Werte sind grün hervorgehoben.

4 Diskussion

Die akute Nierenschädigung (engl. AKI) ist eine der häufigsten Erkrankungen auf Intensivstationen und führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität sowie weiteren Folgeerkrankungen wie kardiovaskulären Krankheiten, chronischer (bis terminaler) Niereninsuffizienz und dadurch auch zu einer hohen ökonomischen Belastung [3, 5, 8].

Die frühzeitige Diagnostik einer AKI stellt weiterhin eine große Herausforderung dar, weil bisherige klinisch etablierte Marker nur die (eingeschränkte) Nierenfunktion und nicht Stress der Nieren oder eine Nierenschädigung messen können und zudem zu unspezifisch sind oder nur verzögert eine Veränderung anzeigen [9, 10].

MicroRNAs kommen in den unterschiedlichsten Geweben vor, sind zum Teil auch gewebespezifisch, tragen zur Entstehung von Krankheiten bei und gelten als vielversprechende neue Biomarker zur Diagnostik verschiedenster Erkrankungen [9, 10, 51]. Diverse Studien der vergangenen Jahre untersuchten bereits die Bedeutung der miRNAs als Marker für AKI und zeigten u.a., dass miRNAs im Serum experimentell eine AKI diagnostizieren können, noch bevor das Serumkreatinin ansteigt [50]. Aguado-Fraile et al. etwa zeigten bereits 2015, dass ausgewählte miRNAs im Serum die spätere Entwicklung einer AKI vorhersagen und somit als Prädispositionsmarker für AKI dienen konnten [58].

In der MiRAKI-Studie wurden ausgewählte miRNAs (miR-1, -16-5p und -122-5p) im Blut kardiochirurgischer Patienten nach stattgehabter Operation am Herzen untersucht und dabei Unterschiede in den Patientengruppen ohne postoperativ entwickelter AKI gegenüber denen mit postoperativ entwickelter AKI identifiziert. Die untersuchten Unterschiede betreffen sowohl den Gehalt der miRNAs im Blut als auch individuelle Ausgangsmerkmale oder beeinflussbare Merkmale der Patienten. Zudem wurde das AKI-Risiko in der MiRAKI-Studie mittels eines bereits etablierten Tests ermittelt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Methodik

4.1.1 Studiendesign

In die MiRAKI-Studie wurden 148 kardiochirurgische Patienten eingeschlossen, bei denen die postoperative Dynamik ausgewählter miRNAs im Plasma untersucht wurde, um eine Voraussage über die Entwicklung einer AKI treffen zu können. Ein ähnliches Studiendesign kann bei diversen Publikationen gefunden werden.

Mehta et al. evaluierten bspw. die Daten von 449.524 Patienten, die einen aortokoronaren Bypass (CABG) und/ oder eine Klappenoperation bekamen in über 600 teilnehmenden Krankenhäusern, um den postoperativen Dialysebedarf voraussagen zu können [90]. Ein Tool zur Voraussage des postoperativen Dialysebedarfs nach einer offenen Operation am Herzen entwickelten Thakar et al. bereits 2005 [67] nach der Untersuchung von 33.217 Patienten. Diese beiden, teils multizentrischen Studien, untersuchten eine deutlich größere Patientenkohorte als hier in dieser Arbeit. Allerdings ging es bei beiden Studien nicht konkret um die Diagnostik einer akuten Nierenschädigung, sondern um eine Entscheidungshilfe zur Therapie.

Aguado-Fraile et al. [58] untersuchten hingegen auch, ob miRNAs eine AKI bei kardiochirurgischen Patienten voraussagen können und kamen zum Ergebnis, dass zirkulierende miRNAs im Serum bereits einige Tage vor Anstieg des Serumkreatinins dazu in der Lage sind, sodass sie als frühe AKI-Biomarker dienen könnten. Dabei wurde lediglich eine Patientenkohorte von 41 kardiochirurgischen Patienten untersucht.

Das Studiendesign der MiRAKI-Studie ähnelt am ehesten dem von Gaeda et al. von 2016 [59], die 115 Patienten untersuchten, die sich einer Herzoperation mit extrakorporaler Zirkulation unterzogen. Das Serumkreatinin und miR-21 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der OP gemessen. MiR-21 zeigte einen signifikant erniedrigten Ausgangswert bei Patienten, die postoperativ eine AKI entwickelten.

Soweit zu diesem Zeitpunkt bekannt, wurde bisher noch keine Studie an einer so großen Kohorte wie die der MiRAKI-Studie durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob nach einer Herzoperation ausgewählte miRNAs bei AKI-Patienten im Plasma verändert nachweisbar sind.

4.1.2 Echtzeitquantifizierung

Die Bestimmung des Gehalts von miRNAs im Plasma ist aus verschiedenen Gründen eine Herausforderung. Zum einen sind reife miRNAs einzelsträngig und sehr kurz, ihr CG-Gehalt variiert je nach miRNA sehr stark, was zu einer großen Bandbreite an Schmelztemperaturen (T_m , s. Kapitel 2.4.2) führt, ihre Zielsequenz ist bereits in den Vorläufern (wie pri- und pre-miRNAs, s. Kapitel 1.2.1) enthalten und manche miRNAs unterscheiden sich nur durch ein einziges Nukleotid voneinander [82]. Die Forschergruppe rund um Benes [82] entwickelte einen neuen Ansatz zur cDNA-Synthese, bei dem eine Reverse Transkription aller in einer Probe enthaltenen miRNAs in einem Schritt möglich ist. Anschließend kann die Konzentration der miRNAs mit Hilfe einer qPCR bestimmt werden. Weitere Vorteile des miQPCR-Protokolls gegenüber bisherigen Standards zur Quantifizierung von miRNAs durch qPCR sind laut der Forschergruppe die Möglichkeit der Anpassung miRNA-spezifischer Primer, eine hohe Sensitivität und Spezifität bei

der Unterscheidung sehr ähnlicher Sequenzen, die Detektion bereits sehr geringer Mengen von RNA und Benötigung von weniger Ausgangsmaterial, sodass es sich um ein vergleichsweise kostengünstiges und effizientes Verfahren handelt. Außerdem konnten alle in der MiRAKI-Studie untersuchten miRNAs (miR-1, -16-5p und -122-5p) mit dieser neuartigen PCR-Methode in nahezu perfekter Korrelation zum bisherigen PCR-Goldstandard nachgewiesen werden [82].

Basierend auf diesen Ergebnissen könnte diese Methode die Erstellung von miRNA-Expressionsprofilen in Zukunft erheblich erleichtern. Dennoch wenden die meisten Forscher zur Expressionsanalyse von miRNAs weiterhin herkömmliche qPCR-Methoden an. Zur Anwendung dieser neuartigen Methode gibt es nur wenige Publikationen.

Die Forschergruppe um Mou et al. [91] verglich 2013 diese neuartige Methode mit zwei anderen Methoden, die ebenfalls auf quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) beruhen. Dabei ging es um den Nachweis von miRNAs aus Reispflanzen. Sie kamen zum Ergebnis, dass die miQPCR zwar das Potenzial hat, miRNAs mit niedrigen Expressionsniveaus nachzuweisen, aber dass diese Methode im Vergleich zu den anderen beiden Methoden am wenigsten erfolgreich war. Die Forscher räumen allerdings auch ein, dass dieses Ergebnis auf eine schlechte Auswahl der Primer zurückzuführen sei.

Die MiRAKI-Studie hat demgegenüber den Vorteil, dass die Methode direkt von einem Mitglied der originalen Forschergruppe rund um Benes erlernt und dass teilweise die in der miQPCR verwendeten originalen Reagenzien in der MiRAKI-Studie verwendet werden konnten.

In einem Review von 2019 von Forero et al. [92] werden unterschiedliche Methoden der Expressionsanalyse von miRNAs vorgestellt und diskutiert. Diese Methoden basieren auf Stem-Loop-, Polyadenylierungs- oder, wie bspw. die miQPCR, auf Ligationsverfahren. Letztendlich kommen die Autoren zum Ergebnis, dass nicht eine einzelne Methode besonders hervorsteht, sondern jede ihre Vor- und Nachteile bietet. Es seien mehr Vergleiche von kommerziell verfügbaren Assays zur Expressionsanalyse von miRNAs notwendig, vor allem wenn man bedenkt, dass in den letzten Jahren immer neuere Methoden entwickelt wurden. Außerdem bestehe weiterhin der Bedarf zur Erforschung der besten Normalisierungsmethoden.

Dass keine einheitliche Methode zur Expressionsanalyse von miRNAs, sowie eine angepasste Normalisierungsmethode existiert, erschwert den Vergleich von Ergebnissen verschiedener Studien miteinander. Die MiRAKI-Studie zeigt eine der vielen Optionen, wie miRNAs aus humanen Blutproben isoliert und quantifiziert werden können. Die Methodik ist relativ neu und wurde in anderen Forschergruppen noch nicht besonders häufig angewendet, sodass die bisherige Datenlage nicht unbedingt für dieses Assay spricht. Allerdings erlaubt es dafür die Quantifizierung jeder erdenklichen miRNA aus menschlichen Blutproben, da jeweils spezifische Primer hergestellt werden können.

4.1.2.1 Normalisierungsmethode und Kontrollpunkte

Eine Herausforderung beim Vergleich von miRNA-Expressionen verschiedener Proben aus Flüssigkeiten wie Plasma ist die Normalisierung. Die Einbeziehung von Referenzgenen im Reaktionsansatz kann bspw. die Zuverlässigkeit der Ergebnisse verbessern und ist nützlich, um Variationen zwischen verschiedenen Proben zu korrigieren. Leider ist die Auswahl von Referenzgenen zur Normalisierung von miRNA-Spiegeln noch recht empirisch. Es können stattdessen eine oder zwei invariante miRNAs (d.h. miRNAs mit konstanter Expression in den Proben) als endogene Kontrollen hinzugefügt werden [93].

Klassischerweise kann dann die relative Menge jeder miRNA mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode geschätzt werden. Dabei wird der Ct-Wert des internen Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Zielgens subtrahiert, sowie die beiden zu untersuchenden Zeitpunkte voneinander subtrahiert [$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Kontrollgen}})_{\text{Zeitpunkt X}} - (\text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Kontrollgen}})_{\text{Zeitpunkt 0}}$]. Schließlich sollten die Ct-Werte, die einen Punkt auf einer exponentiell wachsenden Kurve darstellen, immer in eine lineare Form durch die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ umgewandelt werden. Eine Abwandlung dieser Formel stellt die Normalisierung auf eine endogene Kontrolle dar ($2^{-\Delta\text{Ct}} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Kontrollgen}}$) [94]. Diese Methode ermöglicht die Korrektur der Ergebnisse bei unterschiedlicher Menge an Ausgangsmaterial [94].

Binderup et al. [95] untersuchten 2018 den Einfluss präanalytischer und analytischer Variablen auf die gemessenen miRNA-Spiegel im Plasma, wobei sie verschiedene Zentrifugationsmethoden, PCR-Methoden und synthetische (Cel-miR-39) und humane miRNAs (miR-16) als endogene Kontrollen miteinander verglichen. Sie normalisierten bspw. die durch qPCR gewonnenen Ct-Werte auf die endogen hinzugegebene Cel-miR-39 ($2^{-\Delta\text{Ct}} = \text{Ct}_{\text{miRNA-X}} - \text{Ct}_{\text{miR-39}}$). Die Forscher stellten diverse Unterschiede fest, je nach genutzter endogener Kontrolle und qPCR-Assay, sodass sie die Wichtigkeit einer ausführlichen Beschreibung der verwendeten (prä-)analytischen Faktoren bei der Veröffentlichung von Ergebnissen aus miRNA-Studien betonen, um die Reproduzierbarkeit der Daten durch andere Forschergruppen zu ermöglichen.

In der MiRAKI-Studie wurden nach gutem wissenschaftlichem Standard sowohl die Intra- als auch Inter-Assay-Validität überprüft. Für ersteres wurde die Methode der endogenen Kontrolle angewendet: die synthetische Cel-miR-39 wurde im Isoliervorgang der RNA hinzugegeben (s. Kapitel 2.3) und schließlich in der PCR durch einen spezifischen Primer amplifiziert und nachgewiesen. Der über alle Patientenproben gemittelte Ct-Wert für Cel-miR-39 liegt bei 20,86 (SD 2,57) und zeigt damit eine geringfügig größere Variabilität als die Inter-Assay-Validitätskontrolle. Zur Validitätskontrolle zwischen den Platten (Inter-Assay-Validität) wurde stets eine Doppelbestimmung einer Poolprobe mit den Primern für miR-16-5p und Cel-miR-39 durchgeführt (s. Kapitel 2.4.3). Der Ct-Mittelwert für miR-16-5p in den Poolproben ist 27,54

(SD 0,23) und für Cel-miR-39 23,41 (SD 0,27). Es ist davon auszugehen, dass der letzte Schritt, die Echtzeitquantifizierung der miRNAs, gleichmäßig durchgeführt wurde, da lediglich im Dezimalstellenbereich Unterschiede in den Ct-Werten auftreten.

Dieses Ergebnis passt zu den Erkenntnissen von McDonald et al. [96], die genau wie Binderup et al. (s.o.) präanalytische und analytische Variablen untersuchten, die die Analyse von zirkulierenden miRNAs beeinflussen könnten. Die größte Variabilität der Ergebnisse zeigte sich bei dieser Forschergruppe nämlich beim Extraktionsprozess der RNA. Sie begründen es damit, dass miRNAs sehr kurze Sequenzen sind und in geringen Konzentrationen im Blut vorkommen, sodass eine gleichmäßige Durchführung der RNA-Isolierung mittels Säulen-Reaktionsgefäßen eine große Herausforderung darstellt. Sie empfehlen stattdessen andere Extraktionsmethoden anzuwenden oder eine längere Inkubationszeit des Serums mit Denaturierungspuffern vor Hinzugabe der Cel-miR-39. Dagegen zeigten die reverse Transkription und qPCR die am besten reproduzierbaren Ergebnisse und trugen damit kaum zur Gesamtungenauigkeit der Assays bei.

In der MiRAKI-Studie hätte man vor Hinzugabe der Cel-miR-39 im Extraktionsprozess der RNA aus dem Patientenplasma den Puffer zur Denaturierung von Proteinen und RNasen länger einwirken, oder den Schritt sogar ein zweites Mal wiederholen können. Denkbar wäre auch die Hinzugabe von Heparinase, da Heparin bekanntermaßen die PCR hemmt. Roest et al. konnten beim Vergleich verschiedener RNA-Isolationsmethoden zeigen, dass der Nachweis diverser miRNAs durch Hinzugabe von Heparinase verbessert wurde [97]. Zudem ist nicht auszuschließen, dass im Prozess der cDNA-Synthese Ungenauigkeiten beim Pipettieren aufgetreten sind. Vor allem kleine Pipettierfehler sind während des Pipettiervorganges nicht visuell erkenntlich.

Auch wegen der Unterschiede der Ct-Mittelwerte für Cel-miR-39 in den Patientenproben ist es unabdingbar sie zur Normierung der Daten in der MiRAKI-Studie zu verwenden. Wenn eine Plasmaprobe einem Fehler in der RNA-Isolierung und/ oder cDNA-Synthese unterlegen ist, betrifft dies die gesamte Probe. Da die Differenz zwischen der jeweils zu untersuchenden miRNA und Cel-miR-39 in der gleichen Probe (vom gleichen Patienten zum gleichen Zeitpunkt) gebildet wird, sind alle Proben dadurch normalisiert (bezüglich Intra-Assay-Variationen) und miteinander vergleichbar (bezüglich Inter-Assay-Variationen).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (miQPCR)

Um zu beantworten, ob sich im Plasma von kardiochirurgischen Patienten mit AKI die Expression von miR-1, -16-5p oder -122-5p verändert, wurde der Gehalt dieser miRNAs im Blut von 148 Patienten untersucht.

MiR-1 ist eine im Herzen angereicherte miRNA, die die Kardiogenese und Funktion der Herzmuskelzellen beeinflusst [98], sowie vermutlich auch an der Nierenentwicklung beteiligt ist [99]. Sie ist eine gut untersuchte miRNA und taucht in diversen Forschungsarbeiten auf. Es wurde schon mehrfach vorgeschlagen miR-1 als Biomarker für Myokardinfarkte zu nutzen, da das Expressionsniveau im Blut und auch im Urin nach einem Myokardinfarkt signifikant ansteigt [77, 100].

In Versuchen an Ratten wurden von Brandenburger et al. [101] veränderte Expressionsniveaus von miR-1 nach RIPC festgestellt. Dies ist eine mögliche Erklärung für die bis zum dritten postoperativen Tag kontinuierlich abnehmenden Expressionslevel von miR-1 (vergl. Abb. 8), da zumindest diejenigen Patienten, die mit Hilfe einer HLM operiert wurden, höchstwahrscheinlich Ischämiezeichen entwickelten.

Zhou et al. [102] untersuchten bei Patienten, die sich einer offenchirurgischen Bypassoperation unterzogen, die prä- und postoperativen Expressionsniveaus von miR-1 im Serum und Urin und konnten signifikant erhöhte Werte zu allen postoperativen Zeitpunkten zeigen, sodass sie miR-1 als Biomarker zur Detektion einer Myokardschädigung nach einer solchen Operation vorschlugen. In der MiRAKI-Studie könnte aufgrund des operativen Eingriffs ebenfalls eine Myokardschädigung angenommen werden, allerdings nimmt im postoperativen Verlauf die Expression ab und es fehlen die präoperativen Werte, um eine statistische Auswertung durchführen zu können. Zudem konnte keine signifikante Expressionsveränderung von miR-1 zwischen Patienten mit und ohne AKI festgestellt werden, sodass die postoperativ abnehmende Anreicherung von miR-1 keine Korrelation mit der Entwicklung einer Nierenschädigung zulässt.

MiR-16 wird häufig zur Normierung von PCR-Daten verwendet [95, 103] und kommt im Herzen stark und in den Nieren moderat exprimiert vor [56]. Chen et al. [56] wiesen 2016 nach, dass miR-16 bei Intensivpatienten mit AKI signifikant höher im Urin exprimiert war als bei gesunden Kontrollen, sodass sie als Urin-Biomarker zur Detektion einer AKI genutzt werden könnte. Bei der Untersuchung des Serums konnten jedoch keine Unterschiede zwischen AKI-Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden, was die Daten der MiRAKI-Studie bestätigen können.

Die Untersuchung von miR-16 im Urin der MiRAKI-Patienten wäre notwendig, um das Ergebnis von Chen et al. vollständig zu verifizieren. Diese Forschergruppe wies außerdem im Mausmodell nach, dass eine Überexpression von miR-16 die Nierenfunktion der Mäuse einschränkte, was mit erhöhtem miR-16-Spiegel im Urin einherging. Daher scheint miR-16 zwar eine wichtige pathophysiologische Rolle bei Nierenerkrankungen zu spielen, kommt vermutlich jedoch nur durch Nachweis im Urin als Biomarker in Frage.

Verschiedene Studien [57, 104] konnten zeigen, dass miR-16 im Plasma von Patienten mit AKI in verringerter Menge vorkommt beim Vergleich mit gesunden Kontrollen. Eine solche umgekehrte Korrelation zwischen Expressionsstärke (Ct-Wert) und Nierenfunktion zeigte sich auch bei chronischer Nierenkrankheit [103]. In der MiRAKI-Studie zeigte sich zu den meisten Zeitpunkten ein ähnliches Ergebnis mit höheren Ct-Werten bei Patienten mit AKI als bei Patienten ohne AKI (vergl. Tabellen 11-13), sodass hier eine verringerte Expression bei AKI-Patienten anzunehmen ist, auch wenn sie nicht statistisch signifikant ausfällt. Grund dafür können unterschiedliche Kohorten-Größen und Definitionen der Nierenschädigung beim Vergleich mit anderen Studien sein.

Das Ergebnis der Sequenzierung (NGS) scheint dem entgegenzustehen, da hohe Mengen an miR-16 in den Proben gemessen wurden (s. Kapitel 3.2), allerdings bezieht sich diese Expressionsstärke auf den Vergleich mit anderen miRNAs in den Proben. Beim Vergleich der NGS-Proben mit und ohne AKI fällt letztendlich auch wieder eine geringere Expression von miR-16 bei AKI-Patienten als bei Patienten ohne AKI auf, auch wenn das Ergebnis nicht statistisch signifikant ist. Dies liegt womöglich daran, dass 12 aufeinander abgestimmte Patienten kein ausreichend großes und realistisch verteiltes Patientenkollektiv repräsentieren und das Ergebnis in einer größeren, normalverteilten Kohorte erneut untersucht werden müsste.

MiR-122 ist eine in der Leber stark angereicherte miRNA, was sie zu einem idealen Kandidaten für therapeutische Interventionen macht, da kaum *Off-Target*-Effekte (also Bindungen an andere Proteine oder Moleküle, als das ursprünglich vorgesehene Zielmolekül) in entfernten Organen zu erwarten sind. [105]. Die Interaktion zwischen miR-122 und der RNA von Hepatitis C-Viren kann bspw. blockiert werden, was zu einer Reduktion der Viruslast der Patienten führt [106]. Aber auch andere Organe wurden bereits im Zusammenhang mit miR-122 untersucht. Es zeigten sich bspw. verringerte Konzentrationen von miR-122 im Plasma von Patienten mit Myokardinfarkt [107], sowie im Tierversuch nach Induktion eines Schlaganfalls in Ratten [108], sodass miR-122 ebenfalls als Biomarker für eine Ischämie des Herzens oder Gehirns in Frage kommt.

In der Varianzanalyse war miR-122-5p am ersten postoperativen Tag (t_{24}) signifikant höher exprimiert bei Patienten, die eine höhergradige AKI entwickelten oder noch bis zum siebten

postoperativen Tag entwickeln würden, als bei Patienten ohne AKI (s. Kapitel 3.3, Tabelle 12). Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lin et al. [109], die die Expression von 30 miRNAs im Blut von Patienten mit Sepsis-induzierter AKI untersuchten und zeigen konnten, dass miR-122 zu den hochregulierten miRNAs gehörte. Hier darf allerdings die unterschiedliche Pathophysiologie der AKI (Sepsis-induziert bei Lin et al. vs. CSA-AKI bei MiRAKI) nicht unterschätzt werden, da bei einer Sepsis meist mehrere Organsysteme (Nieren, Leber, usw.) betroffen sind.

Demgegenüber steht allerdings die Erkenntnis von Lee et al. [54], die im Tiermodell zeigten, dass miR-122 in den Nieren von Mäusen mit toxisch-induzierter AKI herunterreguliert wurde. Solch gegensätzliche Ergebnisse können sich durch Unterschiede im untersuchten Organismus und Gewebe erklären lassen: in der MiRAKI-Studie und bei Lin et al. wurde das Blut von Menschen untersucht, wohingegen Lee et al. die Nieren der Tiere untersuchten.

Die Forschergruppe um Rivoli et al. [110] untersuchte miR-122 bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und konnte ebenfalls signifikant verringerte Konzentrationen im Plasma der Erkrankten nachweisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dabei konnten die miR-122-Konzentrationen im Blut der Patienten durch Hämodialyse wieder erhöht werden. Das zeigt, dass verschiedene Nierenfunktionsstörungen bzw. Krankheitsstadien und äußere Einflüsse wie die Hämodialyse die Konzentration von zirkulierenden miRNAs durchaus verändern. Aufgrund dieser letzten Erkenntnis ist bei der Interpretation der miR-122-Expression im Blut bei Verwendung einer Hämodialyse also Vorsicht geboten. Andere Studien zeigten jedoch, dass die Expression einiger miRNAs (wie miR-21 oder -210 [111]) nicht durch Hämodialyse beeinflusst werden. Weitere Studien müssten also durchgeführt werden, um die vermeintliche Instabilität von miR-122 im Blut von Patienten mit AKI, die einer Hämodialyse bedürfen, nachzuweisen. Andererseits stellt dies eine Erklärung dar, weshalb am dritten postoperativen Tag in der MiRAKI-Studie keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede mehr zwischen Patienten mit und ohne AKI festgestellt wurden, da viele Patienten mit hochgradiger AKI zu diesem Zeitpunkt bereits dialysiert wurden.

Die postoperativ signifikant erhöhten Leberenzyme bei Patienten mit AKI gegenüber Patienten ohne AKI deuten auf eine Korrelation zwischen der akuten Nieren- und einer (akuten) Leberschädigung hin (s. Kapitel 3.9.2). Die Korrelation von Nieren- und Lebererkrankungen wurde schon häufig untersucht. Watany et al. [112] versuchten bei Patienten mit Leberzirrhose und AKI zwischen funktionell (aufgrund eines hepatorenalen Syndroms, HRS) und strukturell (durch akute tubuläre Nekrose, ATN) entstandene Schäden zu unterscheiden. Dabei stachen hohe Spiegel anderer miRNAs (u.a. miR-21) in beiden Gruppen im Vergleich mit gesunden Kontrollen hervor, wobei sich ein signifikanter Unterschied zwischen HRS und ATN zeigte. In der MiRAKI-Studie wurden keine Patienten mit nachgewiesener Leberzirrhose eingeschlossen, sodass zumindest

nicht aufgrund dieser Erkrankung die miRNA-Spiegel im Blut beeinflusst wurden. Dennoch ist eine Leberbeteiligung nicht nur aufgrund der erhöhten Leberenzyme, sondern auch der signifikant erhöhten miR-122-Spiegel zu vermuten. Auch die Expression von miR-122 wurde bereits in diversen Studien im Zusammenhang mit Leberschädigungen untersucht. Waidmann et al. [113] wiesen reduzierte miR-122-Spiegel im Serum von Patienten mit hepatischer Dekompensation nach, wobei Patienten mit weiteren Komplikationen wie Aszites, spontaner bakterieller Peritonitis und HRS signifikant niedrigere miR-122-Spiegel hatten als Patienten ohne diese Komplikationen. Sowohl im Tiermodell nach Induktion einer Leberischämie [114], als auch beim Menschen mit toxisch-induzierter akuter Leberschädigung [115] konnten signifikant erhöhte miR-122-Spiegel im Serum nachgewiesen werden beim Vergleich mit gesunden Kontrollen, wobei die Spiegel zum Teil mit der Leberenzymaktivität korrelierten – ähnlich wie es die Daten der MiRAKI-Studie vermuten lassen.

Eine Leberschädigung kann also die miR-122-Spiegel im Blut beeinflussen, sodass man bei Betrachtung aller untersuchten Zusammenhänge und des Vorschlags, miR-122 als Biomarker für diverse Krankheiten zu nutzen, die Spezifität eines darauf basierenden Biomarkers in Frage stellen muss. Die Ergebnisse der MiRAKI-Studie zeigen eindeutig, dass eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter miR-122-Expression im Blut und Patienten mit höhergradiger AKI besteht und dass Patienten ohne AKI oder nur mit leichter AKI solch eine Korrelation nicht bieten. Allerdings lässt sich nicht eindeutig beantworten, was diesem Zusammenhang zugrunde liegt.

4.2.2 TIMP-2 x IGFBP7 – Risikoeinschätzungstest für AKI

Kashani et al. [38] identifizierten 2013 das Produkt aus den Proteinen TIMP-2 und IGFBP7 als wichtigen Biomarker zur Vorhersage einer AKI, der sich vielen anderen bisher beschriebenen Biomarkern bei der Prädiktion von AKI überlegen zeigte. Ab einem Wert $> 0,3$ besteht ein erhöhtes Risiko für höhergradige AKI, Dialysepflicht, permanente Nierendysfunktion oder Tod. Diverse Studien konnten dieses Ergebnis bereits bestätigen.

Meersch et al. untersuchten bspw. 50 Patienten, die sich einer Bypassoperation unterzogen und führten den Risikoeinschätzungstest an Urinproben zu verschiedenen Zeitpunkten durch. Sie kamen zum Entschluss, dass das errechnete Produkt als sensitiver und spezifischer Biomarker zur frühen Voraussage einer AKI nach einem herzchirurgischen Eingriff dienen kann und erzielten vier Stunden nach der OP, also zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie in der MiRAKI-Studie, eine AUC von 0,81 (KI 0,68 – 0,93) [116]. Die verwendete AKI-Definition war dabei älter als die seit 2012 empfohlene Definition von KDIGO. Die AUC in der MiRAKI-Studie beträgt 0,82 (SD 0,06, KI 0,71 – 0,93) und bestätigt damit auch bei Verwendung der neueren AKI-Definition die Ergebnisse der Forschungsgruppe um Meersch.

Oezkur et al. erzielten 2017 ähnliche Ergebnisse in einer Studie mit 150 Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen: ein AKI-Risk[®]-Score > 0,3 bei postoperativer Aufnahme auf der Intensivstation war signifikant mit der Entwicklung einer AKI (nach der Definition von KDIGO) innerhalb von 48 Stunden assoziiert [117], so wie auch in der MiRAKI-Studie.

Wetz et al. untersuchten 42 Patienten, die sich einer Bypassoperation unterzogen und maßen die Konzentrationen von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei zeigte sich, dass sich das errechnete Produkt zur Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI 1 oder 2 zwar am ersten postoperativen Tag nutzen ließ, dass aber keine signifikanten Unterschiede zu früheren Zeitpunkten (bspw. unmittelbar postoperativ, wie in der MiRAKI-Studie) zu finden waren [118]. Weshalb sie, anders als in der MiRAKI-Studie, am Tag der Operation keine signifikanten Ergebnisse erzielten, kann an unterschiedlichen Größen der Patientenkohorten und an der Art der durchgeführten Operationen liegen (bspw. wurden bei Wetz et al. nur Bypassoperationen durchgeführt).

Eine Metaanalyse von Su et al. zeigte 2018, dass die Bestimmung von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin optimalerweise zur Identifizierung von AKI 2 und 3 nach KDIGO angewendet werden kann, da einige Patienten mit AKI 1 vermutlich nur eine funktionelle Einschränkung, jedoch keine tatsächliche Schädigung der Niere aufweisen [119]. Dieses Ergebnis kann durch die MiRAKI-Studie bekräftigt werden, da Patienten mit AKI 1 gegenüber Patienten ohne AKI keinen signifikant erhöhten AKI-Risk[®]-Score zeigten. Die Begründung, dass AKI 1-Patienten nur eine funktionelle Einschränkung haben und der Test sie daher nicht identifizieren könne, kann aus unseren Daten allerdings nicht abgeleitet werden und müsste in weiteren Studien näher untersucht werden.

Wie in Kapitel 1.1.4 erwähnt, gibt es bei der Interpretation von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin einen wichtigen, unabhängigen Faktor zu beachten: das Produkt dieser beiden Proteine scheint bei Diabetikern erhöht zu sein [39]. Ob Diabetes als unabhängiger Faktor zu einem erhöhten AKI-Risk[®]-Score führt, wurde nicht statistisch untersucht und kann daher nicht beantwortet werden, allerdings zeigen die Mittelwerte des AKI-Risk[®]-Scores für Patienten ohne AKI und mit AKI 2 & 3 höhere Werte bei Diabetikern gegenüber Nicht-Diabetikern an. Bei Nicht-Diabetikern mit AKI 2 & 3 ist zudem ein statistisch signifikant erhöhter Score > 0,3 zu finden, jedoch nicht bei den Diabetikern. Dies kann als weiteres Indiz interpretiert werden, dass der Risikoschätzungstest bei Diabetes-Patienten nicht so genau zur Identifizierung von AKI-Risikopatienten genutzt werden kann. Die Interpretation des AKI-Risk[®]-Scores sollte also mit etwas Vorsicht und stets unter Berücksichtigung aller klinischen und individuellen Patientenfaktoren erfolgen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um etwaige Einschränkungen des Tests bei Diabetes-Patienten zu erforschen.

Wie in anderen Studien [116, 117, 119] konnte auch in der MiRAKI-Studie gezeigt werden, dass ein erhöhter Wert von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin bei Ankunft auf einer Intensivstation nach einem herzchirurgischen Eingriff mit erhöhtem Risiko für AKI 2 & 3 einhergeht. Die Aussagekraft dieses klinisch etablierten Risikoeinschätzungstests ist daher höher einzustufen, als die der untersuchten miRNAs im Plasma, da lediglich miR-122 signifikant hochreguliert wurde und aufgrund oben genannter Argumentation (s. Kapitel 4.2.1) nicht als Marker für AKI in Frage kommt.

4.2.3 Nierenfunktionsparameter, Diurese und Volumenbalance

Die laborchemischen Marker der Nierenfunktion (Kreatinin, Cystatin C, GFR-Cystatin, Harnstoff) sind zu fast allen Zeitpunkten sowohl prä- als auch postoperativ signifikant erhöht (bzw. bei der GFR entsprechend erniedrigt) bei Patienten mit AKI verglichen mit Patienten ohne AKI. Das Ergebnis beruht u.a. darauf, dass AKI in Abhängigkeit vom Serumkreatinin-Wert definiert wird und dass auch andere Nierenwerte, wie das Serum-Cystatin oder -Harnstoff sich bei Patienten mit AKI verändern. Interessant ist, dass das Serum-Cystatin bei Ankunft auf der Intensivstation (Zeitpunkt t_0) bereits signifikant höher war bei Patienten, die (später) eine AKI entwickelten. Spahillari et al. [120] stellten 2012 fest, dass Cystatin C im Vergleich zu Kreatinin weniger Fälle von AKI entdeckte und dass die Fälle, die entdeckt wurden, erst zu späteren Zeitpunkten entdeckt wurden. Die Daten der MiRAKI-Studie lassen jedoch vermuten, dass Cystatin C im Serum bereits bei Ankunft auf der Intensivstation als Indiz für die Entwicklung einer AKI genutzt werden kann. Untersuchungen von Koyner et al. [20] zu Cystatin C im Urin zeigten ein ähnliches Ergebnis: in den ersten sechs Stunden nach herzchirurgischem Eingriff kommt eine erhöhte Cystatin C-Ausscheidung im Urin als früher Biomarker für AKI bei Erwachsenen nach einer Herzoperation genutzt werden und das Ausmaß der Cystatin C-Ausscheidung korrelierte sogar mit dem AKI-Schweregrad.

Die Urinuntersuchung bei Ankunft auf Intensivstation (t_0) zeigt für die Proteinmenge, das Albumin und IgG signifikant höhere Werte in der Gruppe mit höhergradiger AKI gegenüber Patienten ohne AKI. Sie könnten also ebenfalls in Zukunft als frühzeitige Indikatoren einer AKI hinzugezogen werden. Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, da in der Literatur bisher kaum Studien diesbezüglich zu finden sind. Eine Untersuchung von Molnar et al. [121] identifizierte Patienten mit Albuminurie nach Herzoperation als Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI. Es gibt daneben diverse Studien, in denen die Elektrolytwerte im Urin von kritisch kranken Patienten untersucht wurden. Veränderungen der Urin-Elektrolytwerte können als Marker für intrarenale mikrozirkulatorische Veränderungen dienen, die einer Erhöhung des Serumkreatinins vorausgehen [122].

Bei einem Organ wie der Niere, das den Volumenhaushalt maßgeblich beeinflusst, ist es besonders interessant die perioperative Volumenbalance zu betrachten, da man diese steuern und gut beeinflussen kann. Die intraoperative Diurese und berechnete Kristalloidbilanz scheinen nicht von Signifikanz zu sein. Dahingegen ist im postoperativ betrachteten Zeitraum von drei Tagen bei Patienten mit höhergradiger AKI eine signifikant geringere Ausscheidungsmenge und höhere positive Kristalloidbilanz gegenüber Patienten ohne AKI zu finden. Eine simple Erklärung für diesen Zusammenhang stellt die Definition der AKI selbst dar: Sie wird u.a. über eine eingeschränkte Urinausscheidungsmenge definiert und diese beeinflusst wiederum die Kristalloidbilanz. Es lässt sich anhand dieser Daten allein daher nicht sagen, wie die Kristalloidbilanz optimalerweise in den postoperativen Tagen nach einem herzchirurgischen Eingriff zu steuern ist. Es ist nicht auszuschließen, dass eine positive Bilanz (höhere Volumeneinfuhr als -ausfuhr) und geringe Ausscheidungsmenge eine AKI maßgeblich beeinflussen. Dies stimmt mit den Daten von Perner et al. [123] überein, die das Flüssigkeitsmanagement bei AKI-Patienten untersuchten: Zum einen sahen die Forscher Hinweise dafür, dass eine höhere Flüssigkeitszufuhr AKI eher fördert und zum anderen, dass Zurückhaltung geboten ist bei der kontinuierlichen Flüssigkeitsverabreichung mit dem Ziel die Urinausscheidung zu erhöhen.

Die Anwendung von HES zeigt in unserer Studie keinen Zusammenhang mit einem gehäuften Auftreten von AKI, obwohl zahlreiche Publikationen bereits gezeigt haben, dass die Gabe von HES die AKI- und Sterblichkeitsrate erhöht – so bspw. das Review von Unal et al. [124]. Vermutlich liegt dieses Ergebnis an unterschiedlichen Patientenkollektiven.

Die Gabe der kolloidalen Lösung Gelatine war intraoperativ und am dritten postoperativen Tag dagegen signifikant höher bei Patienten mit AKI als bei Patienten ohne AKI. Es ist bekannt, dass Gelatinelösungen das Risiko einer Anaphylaxie, so wie die Sterblichkeit und das Auftreten von Nierenversagen und Blutungen erhöhen [125]. Es bleibt auch in einem Review von Ostermann et al. [126] unklar, ob Gelatinelösungen tatsächlich nephrotoxisch sind, aber die potenziellen Risiken und das Fehlen eines klaren Nutzens deuten darauf hin, dass sie bei AKI vermieden werden sollten.

Für die Gabe des Kolloids Albumins zeigen sich in der MiRAKI-Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wobei jedoch auch hier zum Teil nicht ausreichend Daten vorliegen. Bezüglich der Gabe von Albumin bei kritisch kranken Patienten oder Patienten mit AKI herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Im o.g. Review von Ostermann et al. [126] wird Albumin als sicher eingestuft für Risikopatienten oder Patienten mit AKI, obwohl besondere Vorteile gegenüber anderen Infusionslösungen nicht erwiesen sind. In einer Studie von Frenette et al.

[127] war die Verabreichung von Albumin hingegen mit einem dosisabhängigen Risiko für AKI bei kardiochirurgischen Patienten assoziiert.

Die Daten der MiRAKI-Studie deuten darauf, dass ein vorsichtiger Umgang mit kolloidalen Lösungen (wie HES, Gelatine, Albumin) geboten sein sollte, um eine AKI möglichst zu vermeiden. Allerdings ist auch eine umgekehrte Kausalität denkbar: kritisch kranke Patienten benötigen häufiger kreislaufunterstützende Maßnahmen als Gesunde und deswegen erhielten AKI-Patienten bspw. häufiger Gelatine. Der Zusammenhang sollte in einer größeren Patientenkohorte überprüft werden.

4.2.4 Hämodialyse

In den ersten drei postoperativen Tagen mussten insgesamt sechs Patienten hämodialysiert werden. Das entspricht 4,1 % aller Studienteilnehmer. Im Review von Thiele et al. [8] wird der Einsatz eines Nierenersatzverfahren nach einer Herzoperation mit 2 – 6 % angegeben. Der Einsatz einer Hämodialyse bei an höhergradiger AKI erkrankten Patienten ist zudem signifikant häufiger als bei den gesunden Kontrollen. Dass Patienten mit AKI signifikant häufiger ein Nierenersatzverfahren brauchen als Patienten ohne AKI, liegt an der Definition von AKI nach KDIGO selbst: Patienten, die mit einem Nierenersatzverfahren therapiert werden, werden AKI Grad 3 zugeordnet. Die Indikation zur Hämodialyse bei Patienten ohne AKI wird nur in extrem seltenen Fällen gestellt.

4.2.5 Patientencharakteristika

Die Zuordnung zum Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und das präoperative Vorkommen von diversen kardiovaskulären Vorerkrankungen zeigte keine Signifikanz in der Gruppe von Patienten, die eine AKI entwickelten gegenüber den Patienten ohne AKI, ebenso wenig die präoperative Herzfunktion (Links- und rechtsventrikuläre Pumpfunktion) (s. Kapitel 3.7), sodass diese Merkmale keine AKI-Prädispositionsfaktoren darstellen.

Präoperativ wurden verschiedene Risikotests errechnet. Der STS-Score wurde entwickelt, um Mortalität und Morbidität nach einem herzchirurgischen Eingriff beim Erwachsenen vorauszusagen [60-63] . Das Sterberisiko, das Risiko für die Entwicklung eines Nierenversagens und das Risiko für einen Schlaganfall waren in der Gruppe mit höhergradiger AKI stets signifikant erhöht gegenüber den Patienten, die keine AKI entwickelten und können somit gut zur Identifizierung von Risikopatienten vor einer kardiochirurgischen Operation hinzugezogen werden. Der von Thakar et al. [67] entwickelte Cleveland Clinic Score dient der Einschätzung des Risikos für eine postoperativ benötigte Dialyse nach einer Herz-OP. Auch hier zeigten sich

signifikant höhere Werte bei Patienten mit AKI gegenüber ohne, was jedoch nicht weiter verwunderlich ist, da ein Patient vor allem nach Entwickeln einer AKI ein erhöhtes Risiko dafür hat, dialysiert werden zu müssen. Dies stimmt auch mit dem Ergebnis überein, dass Patienten mit AKI gegenüber den Patienten ohne AKI in dieser Kohorte signifikant häufiger dialysiert wurden (s. Kapitel 3.6).

4.2.6 Art und Dauer der Operation

Intraoperative Faktoren, wie der Einsatz einer HLM, zeigten in der MiRAKI-Studie keinen Zusammenhang mit der Entwicklung einer AKI. Massoudy et al. [128] demonstrierten, dass AKI signifikant häufiger und schwergradiger bei Patienten auftrat, die unter Einsatz einer HLM einen Koronararterienbypass (CABG) erhielten, verglichen mit Patienten, die ohne Einsatz einer HLM einen CABG erhielten. Dies konnte jedoch nicht durch Reents et al. [129] ein paar Jahre später bestätigt werden, die ähnlich wie in der MiRAKI-Studie, keinen signifikanten Zusammenhang zwischen CABG ohne Einsatz einer HLM und einer geringeren Rate oder einem geringeren Schweregrad von AKI feststellen konnten.

Bei Patienten mit AKI zeigte sich in der MiRAKI-Studie zudem eine signifikant längere Operationsdauer, die sich im Post-Test für keine der untersuchten Gruppen bestätigen ließ. Die Operationsdauer müsste womöglich in einer größeren Kohorte untersucht werden, um einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen mit und ohne AKI im Post-Test zu finden. Es zeigte sich dafür eine signifikant längere Dauer der extrakorporalen Zirkulation mittels HLM bei Patienten mit höhergradiger AKI. Die Aortenklammzeit zeigte in der MiRAKI-Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In einer ähnlich großen Kohorte in 2021 suchten Serraino et al. [130] nach Risikofaktoren für AKI nach einer Herzoperation. Die Forscher stellten einen Schwellenwert für den Nachweis einer AKI bei 91 Minuten für die Dauer der extrakorporalen Zirkulation und von 51 Minuten für die Aortenklammzeit fest. Bei der Überlebensanalyse sagten das Vorhandensein einer AKI und eine längere extrakorporale Zirkulation und Aortenklammzeit sogar die Mortalität vorher. Die durchschnittliche Dauer der extrakorporalen Zirkulation in der MiRAKI-Studie übersteigt mit 109 ($\pm 70,8$) Minuten bei AKI 0 vs. 177 ($\pm 75,7$) Minuten bei AKI 2 & 3 zwar deutlich den Schwellenwert der genannten Studie von der Forschungsgruppe rund um Serraino, unterstreicht jedoch trotzdem die Wichtigkeit des kurzmöglichsten Einsatzes einer HLM, um die Entwicklung von AKI nach herzchirurgischem Eingriff zu vermindern oder gar zu vermeiden.

4.2.7 Laborchemische Parameter

4.2.7.1 Infektionsparameter

In der MiRAKI-Studie hatten Patienten mit AKI eine signifikant höhere Leukozytenzahl als Patienten ohne AKI. Da diese außerhalb des Normbereichs erhöht ist, kann von einer Leukozytose gesprochen werden, was wiederum für eine akute oder chronische Infektion sprechen kann. Dies steht in Einklang mit den Erkenntnissen von Najjar et al. [131], die eine postoperative Leukozytose als unabhängigen Prädiktor für AKI nach herzchirurgischem Einriff identifizierten. Interessanterweise war in der MiRAKI-Studie bereits intraoperativ eine Leukozytose bei AKI-Patienten erkennbar, sodass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine Korrelation angenommen werden kann. Allerdings bietet die Leukozytenzahl ohne Differenzierung der Subtypen nur sehr unspezifische Informationen, sodass keine sicheren Aussagen getroffen werden können.

Auch die Körpertemperatur ist meist Ausdruck einer Infektion, ist jedoch im perioperativen Setting von vielen Faktoren abhängig, wie bspw. von der intraoperativen Wärmung der Patienten mittels Decken oder Infusionslösungen. In der MiRAKI-Studie zeigte sich intraoperativ eine signifikant höhere Körpertemperatur bei Patienten mit leichter AKI verglichen mit gesunden Patienten, allerdings ist diese mit 37,1 °C (SD 0,57) dennoch normwertig und nicht als Ausdruck von Fieber zu werten. Am dritten postoperativen Tag war die Körpertemperatur bei Patienten mit höhergradiger AKI signifikant niedriger als bei Patienten ohne AKI, was jedoch vermutlich auf die Durchführung einer Hämodialyse zurückzuführen ist, die signifikant häufiger bei Patienten mit AKI 2 & 3 durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 3.6). Klassischerweise kann die Körpertemperatur während der Hämodialyse reguliert werden und die Patienten werden, wenn sie Anzeichen von Fieber zeigen, darüber gekühlt. Es kann angenommen werden, dass Patienten mit höhergradiger AKI eigentlich Fieber als Ausdruck einer systemischen Entzündung (oder Sepsis) hätten, wenn sie nicht gekühlt worden wären.

Infektionsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) sind häufig bei Patienten mit AKI erhöht, weil eine Nierenschädigung mitunter auf dem Boden eines entzündlichen Prozesses entstehen kann. Die Nierenentzündung und Beeinträchtigung der Regeneration der Nierenepithelzellen wird zudem durch das CRP gefördert [132]. Einige leicht zu bestimmende Parameter im Blut und Urin von postchirurgischen Patienten auf einer Intensivstation, u.a. das CRP, konnten in einer Studie von Maciel et al. [133] Patienten mit indirekten Anzeichen einer erhöhten Entzündungsreaktion identifizieren und die Entwicklung einer postoperativen AKI signifikant vorhersagen. In der MiRAKI-Studie zeigten sich ähnlich signifikant erhöhte CRP-Werte am ersten und dritten postoperativen Tag bei Patienten, die eine AKI entwickelten im Vergleich zu Patienten ohne AKI. Auch die Leukozyten zeigten signifikant erhöhte Werte bei Patienten mit AKI gegenüber Patienten ohne AKI.

Procalcitonin (PCT), ein Entzündungsmarker, der insbesondere als Sepsismarker verwendet wird, zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jeeha et al. [134] signifikant erhöht bei Patienten mit AKI. In der genannten Studie von Jeeha et al. identifizierte ein erhöhtes PCT bei Aufnahme auf Intensivstation Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI.

Der berechnete SOFA-Score, der zur Beurteilung eines Organversagens bei Sepsis genutzt wird, ist sowohl präoperativ als auch an den ersten drei postoperativen Tagen signifikant höher bei Patienten, die eine AKI entwickelten, sodass Patienten mit AKI 2 & 3 formell alle das Krankheitsbild einer Sepsis präsentierten, da bei Anstieg des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte die Diagnose einer Sepsis gestellt werden kann [68]. Sepsis ist, wie mehrfach erwähnt, einer der wichtigsten Risikofaktoren für AKI [9]. Eine Erhöhung des SOFA-Scores ist allerdings auch darauf zurückzuführen, dass die Nierenfunktion bei der Errechnung des Scores Einzug findet. Einige Studien empfehlen, den SOFA-Score zur Prädiktion der Mortalität bei AKI hinzuzuziehen. So zum Beispiel die Studie von Skarupskiene et al. [135], die zeigen konnte, dass die Berechnung des SOFA-Scores die genaueste Vorhersage der Mortalität von Patienten mit AKI bietet, die nach einer Herzoperation ein Nierenersatzverfahren benötigten. Auch in der MiRAKI-Studie deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ein bereits präoperativ erhöhter Score $\geq 1,3$ (Score bei Patienten mit AKI 2 & 3 in der MiRAKI-Studie (SD 1,32)) die Erkrankungswahrscheinlichkeit an einer AKI und an einer Sepsis erhöht. Im postoperativen Verlauf sollte der Score auf jeder Intensivstation, insbesondere nach einer Herzoperation, regelmäßig berechnet werden, um frühzeitig eine Organdysfunktion zu erkennen. Wie im Review von Gist et al. [136] erwähnt, ist die Korrelation zwischen AKI und Infektion oftmals eine „Henne-Ei-Diskussion“, wobei mittlerweile mehrere Studien darauf hinweisen, dass Infektionen und Sepsis häufig als Folge von AKI nach herzchirurgischem Eingriff auftreten.

4.2.7.2 Leberwerte

Weil in dieser Arbeit u.a. die in der Leber angereicherte miR-122-5p untersucht wurde, wurden auch zwei laborchemische Leberwerte untersucht. Bilirubin und das Enzym Aspartat-Aminotransferase (AST) waren sowohl intraoperativ als auch an den ersten drei postoperativen Tagen signifikant erhöht bei Patienten mit AKI gegenüber Patienten ohne AKI. Welche Auswirkungen eine AKI auf die Leberfunktion hat, ist in Studien wenig untersucht. Es gibt viele Studien, die AKI bei Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung wie Leberzirrhose oder nach einer Lebertransplantation untersuchen. Ein Review von Coelho et al. [137] untersuchte Patienten mit akutem Leberversagen und stellte fest, dass AKI in dieser Patientengruppe häufig vorkam. Die umgekehrte Korrelation könnte aufgrund der Ergebnisse der MiRAKI-Studie vermutet werden: postoperativ erhöhte Leberwerte bei Patienten mit AKI deuten zumindest auf eine

Funktionseinschränkung der Leber hin. AST kommt zudem in Herzmuskelzellen vor [138] und könnte auch aufgrund der Operation am Herzen erhöht sein. Eine postoperativ signifikante Erhöhung in der Gruppe mit höhergradiger AKI gegenüber Patienten ohne AKI deutet jedoch auch auf eine Korrelation zwischen der akuten Nieren- und einer möglichen Leberschädigung hin. Es finden sich auch zahlreiche Veröffentlichungen zu AKI beim hepatorenenalen Syndrom (HRS). Solé et al. [139] betitelten in ihrem Review von 2018 das HRS als eine Form der AKI, die sich bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose entwickelt und hauptsächlich auf eine Nierengefäßverengung als Folge der systemischen Kreislaufstörung dieser Patientengruppe zurückzuführen ist. Außerdem zeigen diverse AKI-Studien, dass NGAL im Urin zur Differentialdiagnose von AKI bei Leberzirrhose nützlich ist [140-142]. Zukünftige Studien müssten den auch bei uns gefundenen Zusammenhang von Nieren- und Leberschädigung näher untersuchen.

4.2.7.3 Elektrolyte

Elektrolytverschiebungen im Blut zeigen bei Patienten mit AKI signifikant höhere Werte beim Natrium und Kalium und niedrigere beim Calcium verglichen mit gesunden Kontrollen. Die Natrium-Spiegel sind dabei zwar höher bei AKI-Patienten, allerdings liegen sie noch immer im Zielbereich, sodass nicht von einer Hypernatriämie gesprochen werden kann. Die Kalium-Spiegel liegen jedoch außerhalb des Referenzbereichs, sodass bei den Patienten mit höhergradiger AKI von einer milden Hyperkaliämie gesprochen werden kann. Hyperkaliämie tritt bei AKI auf, wenn die renale Kaliumausscheidung durch eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate, des tubulären Flusses oder der Natriumzufuhr im distalen Nephron eingeschränkt ist [143]. Die Calcium-Spiegel liegen in der MiRAKI-Studie bei AKI-Patienten im unteren Referenzbereich, sodass hier eine beginnende Hypocalcämie vorliegt. Immer wieder wurden in klinischen Studien bei Patienten mit nachgewiesener AKI niedrige Calcium-Spiegel festgestellt und als Ursache u.a. eine verringerte renale Calcitriol-Synthese genannt, die wiederum zu einer verringerten Calciumabsorption aus dem Darm und den Nieren und einer verringerten Calciumfreisetzung aus den Knochen führt [144]. So lassen sich die veränderten Elektrolyte in der MiRAKI-Studie letztlich durch die pathophysiologischen Prozesse, die bei einer Nierenschädigung auftreten, erklären.

Der *Base excess* (BE) ist signifikant negativer am ersten und zweiten postoperativen Tag bei Patienten mit höhergradiger AKI und signifikant positiver am dritten postoperativen Tag bei Patienten mit leichter AKI. Diese Art von U-Korrelation findet sich oftmals in der Medizin und konnte von Cheng et al. [145] für die Beziehung zwischen BE und der 30-Tage-Mortalität bei Patienten mit AKI nachgewiesen werden, wobei höhere oder niedrigere BE-Werte das Risiko erhöhten.

Der pH-Wert stellt einen wichtigen Marker für den Allgemeinzustand eines Patienten dar – ein erniedrigter Wert ist bspw. häufig bei einer Sepsis zu finden [146]. Die metabolische Azidose ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer AKI und der Mortalität [147]. Dazu passt auch das Ergebnis in der MiRAKI-Studie, das intraoperativ und am dritten postoperativen Tag signifikante niedrigere pH-Werte bei Patienten mit höhergradiger AKI als bei Patienten ohne AKI zeigt.

Es ist bekannt, dass AKI zu kurzfristigen negativen Folgen wie Flüssigkeitsüberladung und Elektrolyt- oder Säure-Basen-Störungen führt [3] und es gibt Hinweise dafür, dass miRNAs bei der Regulierung der Nierenfunktion, genauer der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Elektrolyten und dem Säure-Basen-Haushalt unverzichtbar sind [148]. Die Ergebnisse der MiRAKI-Studie unterstützen diese Erkenntnisse und Elektrolytveränderungen könnten somit als unterstützendes Kriterium bei der Diagnosestellung einer AKI hinzugezogen werden.

4.2.7.4 Beatmung

Die Beatmung ist ein beeinflussbares Merkmal, das wiederum den Säure-Basen-Haushalt beeinflusst, auf den auch die Nieren Einfluss nehmen. Diverse Beatmungsparameter zeigen signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Dazu zählen signifikant niedrigere Werte des intraoperativen arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (paO_2) und der arteriellen Sauerstoffsättigung (SaO_2) bei Patienten mit leichter AKI gegenüber Patienten ohne AKI und ein intraoperativer Horowitz-Quotient (paO_2/FiO_2) >200 mmHg bei Patienten ohne AKI und <200 mmHg bei Patienten mit AKI. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten von Abreu et al. [149] überein, die zeigen konnten, dass ein Horowitz-Quotient ≤ 200 mmHg ein unabhängiger Risikofaktor für AKI ist und mit denen von Esteve et al. [150], die einen Horowitz-Quotienten ≤ 202 mmHg als Prädiktor für Mortalität und schlechterem Langzeitüberleben nach herzchirurgischem Eingriff identifizierten.

Am ersten postoperativen Tag sprechen die signifikant niedrigeren Werte des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ($paCO_2$) bei Patienten ohne AKI (gegenüber Patienten mit leichter AKI) für eine Hyperventilation, womöglich als Kompensationsmechanismus einer metabolischen Azidose – sofern die Patienten zu diesem Zeitpunkt schon extubiert waren, was nicht auf alle Patienten zutrifft. Patienten ohne AKI zeigen eine stärkere Kompensation einer metabolischen Azidose (mit niedrigerem $paCO_2$) als Patienten mit AKI. Der pH am ersten postoperativen Tag ist bei AKI-Patienten tatsächlich auch niedriger (azidotischer) als bei Patienten ohne AKI, allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz im Post-Test zwischen den Gruppen. Ob Patienten ohne AKI somit eine Azidose tendenziell „besser“ kompensieren können als Patienten mit AKI, kann aus diesen Daten nicht abgeleitet werden. Bei Ankunft auf der Intensivstation war die

Atemfrequenz signifikant höher bei Patienten ohne AKI, was die stärkere Hyperventilation erklärt, allerdings sind zu diesem Zeitpunkt alle Patienten noch intubiert, da alle Patienten postoperativ beatmet auf die Intensivstation gebracht wurden. Somit ist dieses Ergebnis durch ärztlichen Einfluss bedingt. Der Gasaustauschparameter $AaDO_2$ (alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz) ist signifikant höher bei AKI-Patienten. Ein erhöhter Gradient weist meistens auf eine Pathologie der Alveolar-Kapillar-Einheit [151] und damit auf eine schlechtere Oxygenierung hin. Dass Patienten mit AKI eine schlechtere Oxygenierung präsentieren als gesunde Kontrollen, zeigten auch schon Weng et al. [152]. Die Forscher untersuchten die Entwicklung von AKI an Patienten mit Paraquat-Intoxikation, einem Herbizid, und zeigten u.a., dass AKI-Patienten verglichen mit Patienten ohne AKI eine erhöhte $AaDO_2$ hatten. Hypoxie, insbesondere renale Hypoxie, führt nicht nur zur Schädigung von Nierentubulus-Zellen, sondern spielt wahrscheinlich auch eine entscheidende Rolle bei der Progredienz von AKI zu CNV, wie Tanaka et al. [153] in einem Review berichteten.

Die kumulative Beatmungsdauer ist in der MiRAKI-Studie bei Patienten mit leichter und höhergradiger AKI signifikant länger als bei Patienten ohne AKI. Diverse Studien zeigten bereits zuvor, dass AKI zu einer längeren Beatmungsdauer und verlängertem *Weaning* vom Beatmungsgerät führt, so bspw. die Forschungsgruppe um Vieira et al. [154]. Zu allen postoperativen Zeitpunkten zeigte die inspiratorische Sauerstoff-Fraktion (FiO_2) zudem signifikant höhere Werte bei Patienten mit AKI, was am ehesten darauf zurückzuführen ist, dass diese Patienten länger nachbeatmet werden mussten und aufgrund eines erschwerten *Weaning*-Prozesses entsprechend einen höheren Sauerstoffbedarf hatten als Patienten ohne AKI.

Klein et al. [155] arbeiteten 2018 die Interaktionen der Lungen und Nieren bei kritisch kranken Patienten heraus und stellten bidirektionale Interaktionen fest: „Die Raten an Intubation und mechanischer Beatmung sind bei AKI erhöht [...]. Schlussendlich führen pulmonale Komplikationen im Rahmen einer AKI zu erhöhter Mortalität. Umgekehrt können (akute) Lungenerkrankungen und mechanische Beatmung die Entwicklung einer AKI auslösen bzw. eine bestehende AKI aggravieren [...]“. Die Ergebnisse der MiRAKI-Studie bestätigen die Ergebnisse dieser Forschergruppe und verdeutlichen, dass die Beatmung als leicht zu beeinflussender Parameter direkte Auswirkungen auf die Entstehung von AKI haben kann.

4.2.8 Überlebenswahrscheinlichkeit und Mortalität

Zur Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten auf Intensivstationen wurde der APACHE II Score [69] bei Ankunft auf der Intensivstation für jeden Patienten errechnet. Dabei zeigte sich ein signifikant höherer Score bei Patienten mit AKI gegenüber den gesund gebliebenen. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der Studie von Meersch et al. [116], die ebenfalls Patienten

untersuchten, die sich einer Herzoperation unterzogen und den Score zum gleichen Zeitpunkt wie in der MiRAKI-Studie am ersten Tag nach der OP errechneten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Score bei Ankunft auf der Intensivstation nach einer Herzoperation auch hinzugezogen werden sollte, um Patienten frühzeitig zu identifizieren, die im Verlauf an einer AKI erkranken werden. Bei Skarupskiene et al. [135] wurden Patienten mit AKI untersucht, die nach einer Herzoperation ein Nierenersatzverfahren benötigten. Es wurden prognostische Scores und perioperative Risikofaktoren für einen tödlichen Verlauf von der Forschergruppe identifiziert, wobei der APACHE II Score zwar einen niedrigen Vorhersagewert hatte, aber dennoch signifikant höher bei den Nicht-Überlebenden ausfiel verglichen mit den Überlebenden. In der gleichen Studie schnitt der SOFA-Score bezüglich der Vorhersagegenauigkeit eines tödlichen Verlaufs bei AKI-Patienten am besten ab. Auch bei Wang et al. [156] schnitt der SOFA-Score besser ab als der APACHE II Score als Mortalitätsprädiktor bei kritisch kranken Patienten mit AKI. Diese abweichenden Ergebnisse sind am ehesten auf die statistische Auswertungsmethode zurückzuführen, da die Forschergruppen stets verschiedene Scores bezüglich ihrer Vorhersagekraft untersuchten und in der MiRAKI-Studie lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem Score und Auftreten von AKI untersucht wurde. Daraus lassen sich Trends ableiten oder bestätigen, jedoch nicht verschiedene Scores bezüglich ihrer Vorhersagekraft vergleichen.

In der MiRAKI-Studie verstarben nach der Herzoperation sieben Patienten mit AKI und einer ohne. Das entspricht einer Mortalität von 4,8 % mit AKI gegenüber 0,68 % ohne AKI. Die Wahrscheinlichkeit während des Klinikaufenthaltes zu sterben war bei Patienten mit AKI zudem signifikant erhöht gegenüber den gesunden Kontrollen. Mao et al. [5] untersuchten die postoperative Mortalität von kardiochirurgischen Patienten und verglichen die Mortalitätsraten von Patienten mit und ohne AKI aus verschiedenen Studien. Die Mortalitätsraten für Patienten mit AKI nach einem herzchirurgischen Eingriff lagen zwischen 2,6 und 54,4 % je nach Eingriff und AKI-Definition. Die Mortalitätsraten für Patienten ohne AKI lagen zwischen 0,53 % und 7,4 % und waren damit im Durchschnitt deutlich niedriger. Die verwendeten Definitionskriterien für AKI waren zwar älter als die seit 2012 von KDIGO empfohlenen Definitionskriterien, dennoch zeigt sich ein ähnlicher Trend wie in der MiRAKI-Studie. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Patienten mit AKI ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko haben, was einer der wichtigsten Gründe dafür ist, eine AKI frühzeitig zu erkennen. Nateghi Haredasht et al. untersuchten 2022 die Auswirkung verschiedener Definitionen auf die Diagnose von AKI und deren Zusammenhang mit der Mortalität während des Krankenhausaufenthaltes [157]. Sie stellten fest, dass nach den KDIGO-Kriterien mehr Patienten mit AKI identifiziert werden konnten als nach den AKIN (*Acute Kidney*

Injury Network)-Kriterien von 2007 [158] und dass bei allen Definitionen mit zunehmendem AKI-Stadium auch die Mortalität zunahm, so wie in der MiRAKI-Studie.

4.2.9 Entlassungsmerkmale

In der MiRAKI-Studie hatten AKI-Patienten eine signifikant längere Aufenthaltsdauer auf Intensivstation und im Krankenhaus insgesamt, so wie in diversen Studien zuvor auch schon publiziert wurde. Hoste et al. [3] wiesen in ihrem Review von 2018 auf die durch längere Aufenthaltsdauer entstehenden Mehrkosten in der Behandlung dieser Patienten, was einmal mehr die Wichtigkeit hervorhebt, AKI frühestmöglich erkennen und behandeln zu müssen.

Der letzte Kreatininwert vor Entlassung war bei AKI-Patienten signifikant höher als bei Patienten ohne AKI, was auf eine zu dem Zeitpunkt möglicherweise noch anhaltende Nierenschädigung hinweist. Eine Analyse der Erholungsmuster nach AKI von Kellum et al. [159] zeigte, dass 41,2 % der Patienten mit AKI ihre Nierenfunktion vor der Entlassung aus dem Krankenhaus nicht wiedererlangten. Die Erholung nach AKI wurde in der MiRAKI-Studie zwar nicht untersucht, allerdings lässt das Ergebnis eine ähnliche Tendenz wie bei Kellum et al. vermuten.

5 Schlussfolgerung

Die Fragestellung der MiRAKI-Studie konnte beantwortet werden. Beim Vergleich von kardiochirurgischen Patienten mit und ohne AKI wurden in den ersten drei postoperativen Tagen unterschiedliche Veränderungen im Gehalt von miR-1, -16-5p und -122-5p im Plasma festgestellt. MiR-1 und miR-16-5p zeigten postoperativ zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte signifikante Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit und ohne AKI. Bei Ankunft auf Intensivstation (t_0) war miR-122-5p die einzige miRNA, die bei Patienten, die eine AKI entwickeln würden, bereits erhöht exprimiert. Am ersten postoperativen Tag (t_{24}) zeigte sich schließlich eine statistisch signifikante höhere Expression von miR-122-5p bei Patienten mit AKI 2 & 3 verglichen mit den gesunden Kontrollen. Diverse Studien zeigten allerdings auch, dass eine Beeinträchtigung der Leberfunktion die miR-122-Spiegel im Blut beeinflusst, sodass diese miRNA als spezifischer, diagnostischer Marker einer AKI nach kardiochirurgischem Eingriff nicht geeignet erscheint. Da sie bei erhöhter Expression jedoch auf eine Leberschädigung hinweisen kann, sollte der Zusammenhang dieser frühen Expressionserhöhung (24 Stunden nach Herz-OP) im Kontext von AKI als nächstes untersucht werden. Weil der Einsatz einer Hämodialyse die Konzentration von zirkulierenden miRNAs verändern kann, sollte dabei die Auswahl auf expressionsstabile miRNAs fallen.

Die postoperative Expressionsdynamik zeigte tendenziell ähnliche Verläufe bei allen drei miRNAs: Zwischen dem OP-Tag (t_0) und dem ersten postoperativen Tag (t_{24}) nahm zunächst bei allen drei miRNAs in allen Gruppen (mit und ohne AKI) die Expression ab und sank auch am dritten postoperativen Tag (t_{72}) gegenüber dem OP-Tag in den meisten Gruppen und für die meisten miRNAs weiter. Um, wie in anderen Studien beim Vergleich von Expressionsdynamiken vor und nach einer Intervention, eine Aussage über die Veränderungen aufgrund der Intervention (hier des herzchirurgischen Eingriffs) treffen zu können, müsste der präoperative Gehalt der drei miRNAs bei allen Patienten erfasst werden. Dies ist in der MiRAKI-Studie nicht geschehen und eine solche Untersuchung könnte in einem ähnlichen Setting daher Gegenstand zukünftiger Studien sein, um ggf. bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine Prognose zur Entwicklung einer AKI abgeben zu können.

Die Bestimmung der Proteine TIMP-2 x IGFBP7 im Urin (als Risikoeinschätzungstest für AKI) zeigte, dass Patienten, die im Verlauf an einer AKI 2 & 3 erkranken würden, bereits bei Ankunft auf Intensivstation einen signifikant höheren AKI-Risk®-Score hatten als die gesunden Kontrollen. Dies stimmt mit den Erkenntnissen verschiedener anderer Studien überein [116, 117, 119]. Verglichen mit den untersuchten miRNAs, ist die Aussagekraft dieses Risikoeinschätzungstests den untersuchten miRNAs daher überlegen.

Verschiedene Risikotests und Laborparameter zeigten signifikante Unterschiede beim Vergleich der Patientengruppen ohne, mit leichter und höhergradiger AKI. Aufgrund dessen kann eine Empfehlung zur präoperativen Bestimmung des STS-Score und Cleveland Clinic Score als AKI- bzw. Dialyse-Prädiktor vor einem herzchirurgischen Eingriff ausgesprochen werden. Auch der SOFA-Score, der bei Patienten, die später an einer AKI erkrankten, bereits präoperativ signifikant höher ausfiel, könnte als Prädiktor einer AKI hinzugezogen werden. Bei Ankunft auf der Intensivstation erzielte der APACHE II Score (Vorhersage der Überlebenschance) signifikant höhere Werte bei AKI-Patienten und könnte ebenfalls zur Identifikation von Risikopatienten hinzugezogen werden. Generell zeigte sich, dass Patienten mit laborchemischen Parametern im Normbereich eher keine AKI entwickelten. Beeinflussbare Faktoren, wie eine möglichst kurze Dauer der extrakorporalen Zirkulation während der Operation am Herzen, optimales intra- und postoperatives Volumenmanagement und ein zurückhaltender Umgang mit Kolloiden wie Gelatine sollten geboten sein, da sie vermutlich das Auftreten von AKI bei kardiochirurgischen Patienten begünstigen. Optimale Beatmungseinstellungen sollten jederzeit im Fokus von jedem behandelnden Arzt sein, da gezeigt werden konnte, dass AKI-Patienten signifikant häufiger eine Azidose oder schlechtere Oxygenierung hatten als die gesunden Kontrollen. Dies gilt auch für eine postoperative Nachbeatmung, die wann immer möglich, auf ein Minimum reduziert werden sollte.

In der MiRAKI-Studie ist von Vorteil, dass die Untersuchung direkt in vom Menschen gewonnenen Proben (und nicht im Tierversuch) stattgefunden hat, sodass AKI als komplexe Krankheit direkt dort untersucht wurde, wo sie klinisch relevant ist und die bisherige klinische Praxis beeinflussen könnte.

Eine Herausforderung auf der Suche nach dem optimalen Biomarker für AKI bleibt, dass die Definition von AKI auf bereits bekannten Biomarkern beruht, die nicht frei von äußeren Einflüssen sind (wie Serumkreatinin und Diurese, s. Kapitel 1.1.2). Es ist essenziell, weiter nach neuen Markern zu suchen, die frei von äußeren Einflüssen sind. Dabei werden miRNAs im Blut und Urin als neue Generation von AKI-Biomarkern gehandelt. Weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv und mit zusätzlichen Analysen aus Urinproben und dem präoperativen Zeitpunkt sind notwendig, um die Daten der MiRAKI-Studie zu überprüfen.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. KDIGO, *Kidney International Supplements, in Section 1: Introduction and Methodology*. 2012, Elsevier BV. p. 13-18.
2. KDIGO, *Kidney International Supplements, in Summary of Recommendation Statements*. 2012, Elsevier BV. p. 8-12.
3. Hoste, E.A.J., et al., *Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury*. *Nat Rev Nephrol*, 2018. 14(10): p. 607-625.
4. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. *JAMA*, 2005. 294(7): p. 813-8.
5. Mao, H., et al., *Cardiac surgery-associated acute kidney injury*. *Blood Purif*, 2014. 37 Suppl 2: p. 34-50.
6. Parikh, C.R., et al., *Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after adult cardiac surgery*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. 22(9): p. 1748-57.
7. Wang, Y. and R. Bellomo, *Cardiac surgery-associated acute kidney injury: risk factors, pathophysiology and treatment*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. 13(11): p. 697-711.
8. Thiele, R.H., J.M. Isbell, and M.H. Rosner, *AKI associated with cardiac surgery*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015. 10(3): p. 500-14.
9. Brandenburger, T., et al., *Noncoding RNAs in acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2018. 94(5): p. 870-881.
10. Kashani, K., W. Cheungpasitporn, and C. Ronco, *Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption*. *Clin Chem Lab Med*, 2017. 55(8): p. 1074-1089.
11. Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk, *Creatine and Creatinine Metabolism*, P. Review, Editor. 2000.
12. Laterza, O.F., C.P. Price, and M.G. Scott, *Cystatin C: An Improved Estimator of Glomerular Filtration Rate?* *Clinical Chemistry*, 2002. 48(5): p. 699-707.
13. Thongprayoon, C., W. Cheungpasitporn, and K. Kashani, *Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients*. *J Thorac Dis*, 2016. 8(5): p. E305-11.
14. Goldstein, S.L., et al., *Renal recovery*. *Critical Care*, 2014.
15. Fesler, P. and A. Mimran, *Estimation of glomerular filtration rate: what are the pitfalls?* *Curr Hypertens Rep*, 2011. 13(2): p. 116-21.
16. Baum, N., C.C. Dichoso, and C.E. Carlton, *Blood urea nitrogen and serum creatinine. Physiology and interpretations*. *Urology*, 1975. 5(5): p. 583-8.
17. Guder, W.G., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. 2019: Publisher NameSpringer, Berlin, Heidelberg.
18. Soto, K., et al., *Cystatin C as a marker of acute kidney injury in the emergency department*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. 5(10): p. 1745-54.
19. Herget-Rosenthal, S., et al., *Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate*. *Clin Biochem*, 2007. 40(13-14): p. 946-51.
20. 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.
21. Schrezenmeier, E.V., et al., *Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017. 219(3): p. 554-572.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. *Lancet*, 2005. 365(9466): p. 1231-8.
26. 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.
27. Afshari, C.A., et al., *Identification of Putative Gene Based Markers of Renal Toxicity*. *Environmental Health Perspectives*, 2004.
28. 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.
29. 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.
30. Han, W.K., et al., *Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2008. 73(7): p. 863-9.
31. Dieterle, F., et al., *Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium*. *Nat Biotechnol*, 2010. 28(5): p. 455-62.
32. Chmurzynska, A., *The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism*. *J Appl Genet*, 2006. 47(1): p. 39-48.
33. Ferguson, M.A., et al., *Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2010. 77(8): p. 708-14.
34. Zeng, X.-F., et al., *Performance of urinary NGAL and L-FABP in predicting acute kidney injury and subsequent renal recovery: a cohort study based on major surgeries*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2014. 52(5): p. 671-678.
35. Portilla, D., et al., *Liver fatty acid-binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery*. *Kidney Int*, 2008. 73(4): p. 465-72.
36. Cho, E., et al., *The role of urinary liver-type fatty acid-binding protein in critically ill patients*. *J Korean Med Sci*, 2013. 28(1): p. 100-5.
37. Cardenas-Gonzalez, M., M. Pavkovic, and V.S. Vaidya, *Biomarkers of Acute Kidney Injury*, in *Comprehensive Toxicology*. 2018. p. 147-163.
38. Kashani, K., et al., *Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury*. *Crit Care*, 2013. 17(1): p. R25.
39. Bell, M., et al., *Assessment of cell-cycle arrest biomarkers to predict early and delayed acute kidney injury*. *Dis Markers*, 2015. 2015: p. 158658.
40. Etheridge, A., et al., *Extracellular microRNA: a new source of biomarkers*. *Mutat Res*, 2011. 717(1-2): p. 85-90.
41. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. *Clin Chem*, 2010. 56(11): p. 1733-41.
42. 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. 843-54.
43. *miRBase*. 12/2020; Available from: <http://www.mirbase.org/summary.shtml?org=hsa>.
44. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. *Science*, 2003. 299(5612): p. 1540.
45. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. 425(6956): p. 415-9.
46. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. *RNA*, 2003. 9(3): p. 277-9.
47. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. *Cell*, 2009. 136(2): p. 215-233.
48. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome Res*, 2009. 19(1): p. 92-105.
49. Ambros, V., *The evolution of our thinking about microRNAs*. *Nat Med*, 2008. 14(10): p. 1036-40.

50. Aguado-Fraile, E., et al., *MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury*. *Nefrologia*, 2013. 33(6): p. 826-34.
51. Bonnet, S., et al., *Clinical value of non-coding RNAs in cardiovascular, pulmonary, and muscle diseases*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020. 318(1): p. C1-C28.
52. Wei, Q., et al., *Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(5): p. 756-61.
53. Zhong, X., et al., *miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2013. 56(3): p. 663-74.
54. Lee, C.G., et al., *Discovery of an integrative network of microRNAs and transcriptomics changes for acute kidney injury*. *Kidney International*, 2014. 86(5): p. 943-953.
55. Lorenzen, J.M., et al., *MicroRNA-24 antagonism prevents renal ischemia reperfusion injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. 25(12): p. 2717-29.
56. Chen, H.H., et al., *Urinary miR-16 transactivated by C/EBPbeta reduces kidney function after ischemia/reperfusion-induced injury*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 27945.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Shahian, D.M. and F.H. Edwards, *The Society of Thoracic Surgeons 2008 Cardiac Surgery Risk Models: Introduction*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2009. 88(1): p. S1.
61. Shahian, D.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: part 1--coronary artery bypass grafting surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2009. 88(1 Suppl): p. S2-22.
62. O'Brien, S.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: part 2--isolated valve surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2009. 88(1 Suppl): p. S23-42.
63. Shahian, D.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2008 cardiac surgery risk models: part 3--valve plus coronary artery bypass grafting surgery*. *Ann Thorac Surg*, 2009. 88(1 Suppl): p. S43-62.
64. Thourani, V.H., et al., *The Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery Database: 2017 Update on Research*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2017. 104(1): p. 22-28.
65. Shahian, D.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2018 Adult Cardiac Surgery Risk Models: Part 1—Background, Design Considerations, and Model Development*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2018. 105(5): p. 1411-1418.
66. O'Brien, S.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2018 Adult Cardiac Surgery Risk Models: Part 2—Statistical Methods and Results*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2018. 105(5): p. 1419-1428.
67. Thakar, C.V., et al., *A clinical score to predict acute renal failure after cardiac surgery*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(1): p. 162-8.
68. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *JAMA*, 2016. 315(8): p. 801.
69. Knaus, W.A., et al., *APACHE II: a severity of disease classification system*. *Crit Care Med*, 1985. 13(10): p. 818-29.
70. Oshlack, A., M.D. Robinson, and M.D. Young, *From RNA-seq reads to differential expression results*. *Genome Biology*, 2010. 11(12): p. 220.
71. Knippers, R., *Expressionsanalytik durch RNA-Seq*, in *Molekulare Genetik*, A. Nordheim and R. Knippers, Editors. 2018, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 498-499.
72. Robinson, M.D. and A. Oshlack, *A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data*. *Genome Biology*, 2010. 11(3): p. R25.
73. *MicroRNA/small RNA NGS Data Analysis Report*. 2018, EXIQON.

74. Git, A., et al., *Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression*. RNA, 2010. 16(5): p. 991-1006.
75. Baxeavanis, A.D., G.D. Bader, and D.S. Wishart, *Bioinformatics*. 2020: Wiley.
76. Benjamini Y., H.Y., *Controlling the false Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1995. 57, No. 1: p. 289-300.
77. Gidlöf, O., et al., *Cardiospecific microRNA Plasma Levels Correlate with Troponin and Cardiac Function in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction, Are Selectively Dependent on Renal Elimination, and Can Be Detected in Urine Samples*. Cardiology, 2011. 118(4): p. 217-226.
78. *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Handbook*. 2017, QIAGEN.
79. Nowrousian, M., *PCR-Analytik*, in *Praktikum der Molekulargenetik*, U. Kück, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 221-245.
80. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 2008, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 1530-1531.
81. Promega. *What is Real-Time qPCR?* 12/2020; Available from: <https://www.promega.de/products/pcr/qpcr-and-rt-qpcr/#related-resources>.
82. Benes, V., et al., *Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay*. Sci Rep, 2015. 5: p. 11590.
83. Castoldi, M., *Rules for primer design for miQPCR (v2.0)*. 2018: personal guide.
84. *Melting Temperature*, in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 2008, Springer Netherlands. p. 1178-1178.
85. *Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System*, A. Bioystems, Editor. 2010.
86. Guzzi, L.M., et al., *Clinical use of [TIMP-2]•[IGFBP7] biomarker testing to assess risk of acute kidney injury in critical care: guidance from an expert panel*. Critical Care, 2019. 23(1).
87. *NephroCheck®*. 12/2020; Available from: <https://www.nephrocheck.com/faqs/>.
88. *MicroRNA/small RNA NGS Result File (miRNA AKI vs. NO AKI)*. 2018, EXIQON.
89. Lang, R.M., et al., *Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. J Am Soc Echocardiogr, 2015. 28(1): p. 1-39 e14.
90. Mehta, R.H., et al., *Bedside tool for predicting the risk of postoperative dialysis in patients undergoing cardiac surgery*. Circulation, 2006. 114(21): p. 2208-16; quiz 2208.
91. Mou, G., et al., *Evaluation of three RT-qPCR-based miRNA detection methods using seven rice miRNAs*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. 77(6): p. 1349-53.
92. Forero, D.A., et al., *qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs*. BioTechniques, 2019. 67(4): p. 192-199.
93. Benes, V. and M. Castoldi, *Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available*. Methods, 2010. 50(4): p. 244-9.
94. 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.
95. Binderup, H.G., et al., *Quantification of microRNA levels in plasma – Impact of preanalytical and analytical conditions*. PLOS ONE, 2018. 13(7): p. e0201069.
96. McDonald, J.S., et al., *Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges*. Clinical Chemistry, 2011. 57(6): p. 833-840.
97. Roest, H.P., I.J. JNM, and L.J.W. van der Laan, *Evaluation of RNA isolation methods for microRNA quantification in a range of clinical biofluids*. BMC Biotechnol, 2021. 21(1): p. 48.

98. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction)*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016. 94: p. 107-121.
99. Zhang, L., T. Wu, and S. Qiao, *miR-1 and miR-802 regulate mesenchymal-epithelial transition during kidney development by regulating Wnt-4/beta-catenin signaling*. Am J Transl Res, 2019. 11(11): p. 7000-7008.
100. Cheng, Y., et al., *A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction*. Clinical Science, 2010. 119(2): p. 87-95.
101. Brandenburger, T., et al., *Effects of remote ischemic preconditioning and myocardial ischemia on microRNA-1 expression in the rat heart in vivo*. Shock, 2014. 42(3): p. 234-8.
102. Zhou, X., et al., *Urine and Serum MicroRNA-1 as Novel Biomarkers for Myocardial Injury in Open-Heart Surgeries with Cardiopulmonary Bypass*. PLoS ONE, 2013. 8(4): p. e62245.
103. Neal, C.S., et al., *Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2011. 26(11): p. 3794-802.
104. Ma, Y., et al., *Serum miRNA expression and correlation with clinical characteristics in acute kidney injury*. Int J Clin Exp Pathol, 2017. 10(8): p. 8721-8726.
105. Brandenburger, T. and J.M. Lorenzen, *Diagnostic and Therapeutic Potential of microRNAs in Acute Kidney Injury*. Frontiers in Pharmacology, 2020. 11.
106. Janssen, H.L.A., et al., *Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA*. New England Journal of Medicine, 2013. 368(18): p. 1685-1694.
107. D'Alessandra, Y., et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. European Heart Journal, 2010. 31(22): p. 2765-2773.
108. Li, D.B., et al., *Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats*. Front Aging Neurosci, 2018. 10: p. 24.
109. Lin, Y., et al., *Expression patterns and prognostic value of miR-210, miR-494, and miR-205 in middle-aged and old patients with sepsis-induced acute kidney injury*. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2019.
110. Rivoli, L., et al., *The effect of renal dysfunction and haemodialysis on circulating liver specific miR-122*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2017. 83(3): p. 584-592.
111. Martino, F., et al., *Circulating microRNAs are not eliminated by hemodialysis*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e38269.
112. Watany, M.M., R.Y. Hagag, and H.I. Okda, *Circulating miR-21, miR-210 and miR-146a as potential biomarkers to differentiate acute tubular necrosis from hepatorenal syndrome in patients with liver cirrhosis: a pilot study*. Clin Chem Lab Med, 2018. 56(5): p. 739-747.
113. Waidmann, O., et al., *Serum MicroRNA-122 Predicts Survival in Patients with Liver Cirrhosis*. PLoS ONE, 2012. 7(9): p. e45652.
114. Van Caster, P., et al., *Circulating microRNA-122, -21 and -223 as potential markers of liver injury following warm ischaemia and reperfusion in rats*. Mol Med Rep, 2015. 12(2): p. 3146-50.
115. Starkey Lewis, P.J., et al., *Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury*. Hepatology, 2011. 54(5): p. 1767-1776.
116. 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.
117. Oezkur, M., et al., *TIMP-2*IGFBP7 (Nephrocheck®) Measurements at Intensive Care Unit Admission After Cardiac Surgery are Predictive for Acute Kidney Injury Within 48 Hours*. Kidney and Blood Pressure Research, 2017. 42(3): p. 456-467.
118. 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.
119. Su, L.J., et al., *Predictive value of cell cycle arrest biomarkers for cardiac surgery-associated acute kidney injury: a meta-analysis*. British Journal of Anaesthesia, 2018. 121(2): p. 350-357.

120. Spahillari, A., et al., *Serum Cystatin C– Versus Creatinine-Based Definitions of Acute Kidney Injury Following Cardiac Surgery: A Prospective Cohort Study*. American Journal of Kidney Diseases, 2012. 60(6): p. 922-929.
121. Molnar, A.O., et al., *Association of postoperative proteinuria with AKI after cardiac surgery among patients at high risk*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. 7(11): p. 1749-60.
122. Maciel, A.T. and D. Vitorio, *Urine biochemistry assessment in critically ill patients: controversies and future perspectives*. Journal of Clinical Monitoring and Computing, 2017. 31(3): p. 539-546.
123. Perner, A., et al., *Fluid management in acute kidney injury*. Intensive Care Med, 2017. 43(6): p. 807-815.
124. Unal, M.N. and K. Reinhart, *Understanding the Harms of HES: A Review of the Evidence to Date*. Turk J Anaesthesiol Reanim, 2019. 47(2): p. 81-91.
125. Moeller, C., et al., *How safe is gelatin? A systematic review and meta-analysis of gelatin-containing plasma expanders vs crystalloids and albumin*. Journal of Critical Care, 2016. 35: p. 75-83.
126. Ostermann, M., K. Liu, and K. Kashani, *Fluid Management in Acute Kidney Injury*. Chest, 2019. 156(3): p. 594-603.
127. Frenette, A.J., et al., *Albumin administration is associated with acute kidney injury in cardiac surgery: a propensity score analysis*. Critical Care, 2014. 18(6).
128. Massoudy, P., et al., *Coronary artery bypass surgery and acute kidney injury--impact of the off-pump technique*. Nephrol Dial Transplant, 2008. 23(9): p. 2853-60.
129. Reents, W., et al., *Acute kidney injury after on-pump or off-pump coronary artery bypass grafting in elderly patients*. Ann Thorac Surg, 2014. 98(1): p. 9-14; discussion 14-5.
130. Serraino, G.F., et al., *Risk factors for acute kidney injury and mortality in high risk patients undergoing cardiac surgery*. PLoS One, 2021. 16(5): p. e0252209.
131. Najjar, M., M. Salna, and I. George, *Acute kidney injury after aortic valve replacement: incidence, risk factors and outcomes*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2015. 13(3): p. 301-16.
132. Tang, Y., et al., *Role of C-reactive protein in the pathogenesis of acute kidney injury*. Nephrology, 2018. 23: p. 50-52.
133. Maciel, A.T., L. Delphino Salles, and D. Vitorio, *Simple blood and urinary parameters measured at ICU admission may sign for AKI development in the early postoperative period: a retrospective, exploratory study*. Renal Failure, 2016. 38(10): p. 1607-1615.
134. Jeeha, R., et al., *Serum procalcitonin levels predict acute kidney injury in critically ill patients*. Nephrology (Carlton), 2018. 23(12): p. 1090-1095.
135. Skarupskiene, I., et al., *Mortality prediction in patients with acute kidney injury requiring renal replacement therapy after cardiac surgery*. Medicina (Kaunas), 2017. 53(4): p. 217-223.
136. Gist, K.M. and S. Faubel, *Infection Post-AKI: Should We Worry?* Nephron, 2020. 144(12): p. 673-676.
137. Coelho, S., et al., *Transient and persistent acute kidney injury in acute liver failure*. Journal of Nephrology, 2019. 32(2): p. 289-296.
138. M., G.A. and G.O. A., *Aspartat-Aminotransaminase*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019, Springer: Berlin, Heidelberg.
139. Sole, C., et al., *Hepatorenal syndrome in the era of acute kidney injury*. Liver Int, 2018. 38(11): p. 1891-1901.
140. Fagundes, C., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as biomarker in the differential diagnosis of impairment of kidney function in cirrhosis*. Journal of Hepatology, 2012. 57(2): p. 267-273.
141. Verna, E.C., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts mortality and identifies acute kidney injury in cirrhosis*. Dig Dis Sci, 2012. 57(9): p. 2362-70.
142. Belcher, J.M., et al., *Kidney biomarkers and differential diagnosis of patients with cirrhosis and acute kidney injury*. Hepatology, 2014. 60(2): p. 622-32.

143. Hunter, R.W. and M.A. Bailey, *Hyperkalemia: pathophysiology, risk factors and consequences*. Nephrol Dial Transplant, 2019. 34(Suppl 3): p. iii2-iii11.
144. Leaf, D.E. and M. Christov, *Dysregulated Mineral Metabolism in AKI*. Semin Nephrol, 2019. 39(1): p. 41-56.
145. Cheng, Y., et al., *Association Between Base Excess and Mortality Among Patients in ICU With Acute Kidney Injury*. Front Med (Lausanne), 2021. 8: p. 779627.
146. Philipsenburg, C., et al., *Pathogenetische Aspekte der Sepsis-induzierten Mikrozirkulationsstörung und des septischen Schocks*. Anästhesiologie & Intensivmedizin, 2016(57): p. 582-595.
147. Hu, J., et al., *Metabolic acidosis as a risk factor for the development of acute kidney injury and hospital mortality*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017. 13(5): p. 2362-2374.
148. 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.
149. de Abreu, K.L., et al., *Acute kidney injury in critically ill patients with lung disease: kidney-lung crosstalk*. Rev Bras Ter Intensiva, 2013. 25(2): p. 130-6.
150. Esteve, F., et al., *Evaluation of the PaO₂/FiO₂ ratio after cardiac surgery as a predictor of outcome during hospital stay*. BMC Anesthesiology, 2014. 14: p. 83.
151. Hantzidiamantis, P.J. and E. Amaro, *Physiology, Alveolar to Arterial Oxygen Gradient*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
152. Weng, C.H., et al., *Predictors of acute kidney injury after paraquat intoxication*. Oncotarget, 2017. 8(31): p. 51345-51354.
153. Tanaka, S., T. Tanaka, and M. Nangaku, *Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. 307(11): p. F1187-95.
154. Vieira, J.M.J., et al., *Effect of acute kidney injury on weaning from mechanical ventilation in critically ill patients**. Critical Care Medicine, 2007. 35(1): p. 184-191.
155. Klein, S.J., et al., *Lunge-Nieren-Interaktionen bei kritisch Kranken*. Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2018. 113(6): p. 448-455.
156. Wang, H., et al., *SOFA score is superior to APACHE-II score in predicting the prognosis of critically ill patients with acute kidney injury undergoing continuous renal replacement therapy*. Renal Failure, 2020. 42(1): p. 638-645.
157. Nateghi Haredasht, F., et al., *The effect of different consensus definitions on diagnosing acute kidney injury events and their association with in-hospital mortality*. J Nephrol, 2022.
158. 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.
159. Kellum, J.A., et al., *Recovery after Acute Kidney Injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. 195(6): p. 784-791.

7 Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Timo Brandenburger, dem ich die Einführung in die Durchführung von klinisch-experimentellen Studien zu verdanken hab und der mir stets mit Rat und Tat während des gesamten Promotionsprozesses zur Seite stand. Vielen herzlichen Dank auch an seine Forschungsgruppe: Dr. med. Thomas Dimski, Dr. med. Manon Schieß und Dr. med. Laura Huthmann.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Kindgen-Milles und allen Oberärzt:innen bedanken für die Möglichkeit der Realisierung dieser Studie auf der multidisziplinären chirurgischen Intensivstation und der großartigen Hilfe bei der Rekrutierung von Patient:innen.

Ein riesen Dank geht auch an das Team im Labor der Experimentellen Anästhesie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer, ohne dessen Hilfe ich niemals all die Techniken erlernt hätte, die für diese Dissertation notwendig waren – insbesondere danke ich Claudia Dohle und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Annika Raupach.

Alex, ich danke dir von Herzen, dass du mich nicht nur im Studium und während des gesamten Weges zur Finalisierung dieser Arbeit unterstützt hast, sondern auch immer an meiner Seite bist. Ich kann es kaum erwarten, mit dir noch alle kommenden Wege zu beschreiten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Brüdern und Großeltern. Ohne eure Liebe und endlose Unterstützung jeglicher Art wäre ich nicht dort, wo ich heute bin. Obrigada!