

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

Nachweis von MicroRNA zur Diagnose einer akuten Nierenschädigung im Blut kardiochirurgischer Patienten (MiRAKI-Studie)

Dissertation

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

vorgelegt von
Alexander Merkes

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. Udo Boeken

I. Zusammenfassung

Die akute Nierenschädigung (engl. *acute kidney injury*, AKI) ist definiert als jede akute Schädigung der Niere, die mit einer Einschränkung der Nierenfunktion bis hin zum kompletten Nierenversagen einhergeht. Sie ist ein häufiges Krankheitsbild auf der Intensivstation und wird oft ausgelöst durch eine Sepsis oder kardiochirurgische Operationen. Dabei sind Nierenfunktionsparameter wie Serum-Kreatinin und Diurese der Goldstandard in der Diagnostik. Da diese erst verzögert eine AKI anzeigen, wird intensiv nach neuen Biomarkern zur Diagnostik gesucht, wobei in den letzten Jahren MicroRNAs (miRNAs), nichtkodierende RNA-Fragmente, die in die Genexpression eingreifen, in den Forschungsfokus gerückt sind. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob miRNAs eine AKI bei Patienten nach kardiochirurgischer Operation frühzeitig detektieren können.

In dieser Studie wurden Plasma-Proben von 148 Patienten jeweils präoperativ ($t_{\text{prä}}$), bei Ankunft auf der Intensivstation (t_0), 24 Stunden (t_{24}) und 72 Stunden (t_{72}) postoperativ entnommen und mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) analysiert, um die Konzentration vorher ausgewählter miRNAs in den Proben festzustellen. Die Auswahl dieser miRNAs erfolgte anhand einer Genanalyse von ausgewählten Plasmaproben, wodurch miR-1, miR-16 und miR-29c für die weitere Analyse identifiziert wurden. Zusätzlich wurden Parameter der Hämodynamik, Herzfunktionsmarker, perioperative Transfusionen, Volumenhaushalt, laborchemische Nierenparameter, sowie zwei prädiktive Scores zur Vorhersage einer AKI analysiert. Um einen eventuellen diagnostischen Vorteil der miRNAs gegenüber einem bereits kommerziell erhältlichen und verifizierten Stressmarker darstellen zu können, wurde das Produkt der Proteine TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 mittels *Bedside-Test* im Urin an t_0 bestimmt.

Bei der Analyse der miRNAs mittels qPCR war die Expression von miR-21 bei Patienten mit AKI Grad 2 oder 3 zum Zeitpunkt t_{24} signifikant erhöht ($p=0,003$) verglichen mit Patienten ohne AKI. Das Produkt aus TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 $>0,3$ konnte zudem als frühester Marker für eine AKI (zum Zeitpunkt t_0) identifiziert werden ($p=0,022$). Patienten mit AKI 2 oder 3 erhielten signifikant häufiger intra- und postoperativ Transfusionen, sowie höhere Dosen an kreislaufaktiven Medikamenten. Eine Erhöhung der prädiktiven AKI-Scores korrelierte ebenfalls signifikant mit dem Auftreten einer AKI. In zukünftigen Studien könnte miR-21 als Marker zur frühen Erkennung einer AKI weiter evaluiert werden, ebenso wie die Untersuchung von miRNAs im Urin statt im Plasma. Ein neuer Risiko-Score, der etwa bekannte Risikofaktoren und AKI-Scores mit Proteinmarkern, Transfusions- und Katecholaminbedarf kombiniert, könnte basierend auf diesen Daten entwickelt und näher untersucht werden.

English version:

Acute kidney injury (AKI) is defined as any acute damage to the kidney that is associated with a reduction in kidney function or even complete kidney failure. It is a common clinical picture in intensive care units and is often triggered by sepsis or cardiosurgical operations. Renal function parameters such as serum creatinine and diuresis are the gold standard in diagnostics. Since these only indicate AKI with a delay, there is an intensive search for new biomarkers for diagnosis, whereby microRNAs (miRNAs), non-coding RNA fragments that intervene in gene expression, have become the focus of research in recent years. This study investigated whether miRNAs can detect AKI early in patients after cardiac surgery.

In this study, plasma samples were collected from 148 patients each preoperatively ($t_{prä}$), on arrival in the intensive care unit (t_0), 24 hours (t_{24}) and 72 hours (t_{72}) postoperatively and analysed by quantitative real-time PCR (qPCR) to determine the concentration of pre-selected miRNAs in the samples. These miRNAs were selected based on a genetic analysis of selected plasma samples, identifying miR-1, miR-16 and miR-29c for further analysis. In addition, parameters of haemodynamics, cardiac function markers, perioperative transfusions, volume balance, renal laboratory parameters, and two predictive scores for AKI were analysed. In order to demonstrate a possible diagnostic advantage of miRNAs over an already commercially available and verified stress marker, the product of the proteins $TIMP-2 * IGFBP7 / 1000$ was determined by means of a bedside test in urine at t_0 .

In the analysis of miRNAs by qPCR, the expression of miR-21 was significantly increased in patients with AKI grade 2 or 3 at t_{24} ($p=0.003$) compared with patients without AKI. The product of $TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 >0.3$ was also identified as the earliest marker of AKI (at time t_0) ($p=0.022$). Patients with AKI 2 or 3 were significantly more likely to receive intra- and postoperative transfusions, as well as higher doses of circulatory-active drugs. An increase in predictive AKI scores also correlated significantly with the occurrence of AKI. Future studies could further evaluate miR-21 as a marker for early detection of AKI, as well as testing miRNAs in urine rather than plasma. A new risk score, such as combining known risk factors and AKI scores with protein markers, transfusion and catecholamine requirements, could be developed and further investigated based on these data.

II. Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
AKI	Acute kidney injury (akute Nierenschädigung)
ANOVA	<i>analysis of variance, Varianzanalyse</i>
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cel-miR-39	<i>Caenorhabditis elegans</i> MicroRNA-39
CCL14	<i>C-C motif chemokine ligand 14</i> ()
cDNA	<i>Copy desoxyribonucleic acid</i> (Kopie-Desoxyribonukleinsäure)
CK (-MB)	Creatinkinase (-Muscle-Brain type, Isoenzym de Creatinkinase)
CRF	<i>case report form</i> (pseudonymisierte Datentabelle)
CSA-AKI	<i>Cardiac surgery associated acute kidney injury</i> , kardiochirurgisch assoziierte akute Nierenschädigung
C _t /C _q	<i>Threshold cycle/ quantification cycle</i>
ECLS	<i>extracorporeal Life Support</i> , extrakorporale Lebensunterstützung
ECMO	<i>extracorporeal membrane oxygenation</i> , extrakorporale Membranoxygenierung
FDR	<i>False Discovery Rate</i> , Falscherkennungsrate
FPRR	<i>fluoro-photoacoustic polymeric renal reporter</i>
G	Guanin
(e)GFR	<i>(estimated) glomerular filtration rate</i> ; (geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
GGT	γ-Glutamyl-Transferase
HES	Hydroxyethylstärke
IABP	Intraaortale Ballonpumpe
ICU	<i>Intensive Care Unit</i> (Intensivstation)
IGFBP7	<i>insulin like growth factor-binding protein 7</i>
IL-18	Interleukin 18
k.A.	keine Angabe
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KI	Konfidenzintervall
KIM-1	<i>Kidney injury molecule 1</i>
L-FABP/FABP1	<i>Liver-type fatty acid-binding protein</i>
logFC	<i>log fold change</i> (Logarithmus der Differentialexpression)
MAD	mittlerer arterieller Druck
mind.	mindestens
miQPCR	microRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR
miRNA/MicroRNA	<i>micro ribonucleic acid</i> (Mikroribonukleinsäuren)
MM	Mastermix
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Messenger-Ribonukleinsäure)

NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenzierung)
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
OP	Operation
(q)PCR	(quantitative) <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAsen	Ribonukleasen
RPM	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRT	<i>renal replacement therapy</i> (Nierenersatzverfahren)
RVAD	<i>Right Ventricular Assist Device</i> , Rechtsventrikuläres Unterstützungssystem
s.	siehe
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
STS-Score	<i>Society of thoracic surgeons Score</i>
T	Thymin
t₀	Zeitpunkt bei Ankunft auf der Intensivstation
T1/2/3	<i>Tailing Mix 1/2/3</i>
t₂₄	24 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation
t₇₂	72 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation
TIMP-2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
TMM	<i>trimmed mean of M-values normalization method</i>
t_{prä}	Zeitpunkt unmittelbar präoperativ
U	Uracil
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht translaterter Bereich)
z. B.	zum Beispiel

Einheit	Erläuterung
h	Stunde(n)
ml	Milliliter
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
m²	Quadratmeter
°C	Grad Celsius
fmol	Femtomol
µl	Mikroliter
dl	Deziliter
g	Gramm
l	Liter
mOsm	Milliosmolarität

III. Inhaltsverzeichnis

Inhalt

I. Zusammenfassung	I
II. Abkürzungs- und Einheitenverzeichnis	III
III. Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Acute Kidney Injury</i> (AKI).....	1
1.1.1 Definition und Einteilung.....	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Diagnostik.....	4
1.1.4 Neue Biomarker.....	5
1.2 MicroRNAs	7
1.2.1 Funktion	7
1.2.2 Beteiligung von miRNAs an verschiedenen pathologischen Prozessen.....	9
1.2.3 MicroRNAs bei AKI	11
1.3 Ziele der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Studiendesign.....	13
2.1.1 Ein-/Ausschlusskriterien.....	14
2.1.2 Probenentnahmen.....	15
2.1.3 <i>Case report form</i> (CRF).....	15
2.2 <i>Next generation sequencing</i> (NGS).....	16
2.3 Quantifizierung der miRNAs.....	17
2.3.1 RNA-Isolierung.....	19
2.3.2 cDNA-Synthese	20
2.3.3 Primer-Design	22
2.3.4 miQPCR.....	23
2.4 TIMP-2 und IGFBP7 im Urin	24
2.5 Reagenzien, Geräte und Software.....	25
2.6 Statistische Auswertung	26
3 Ergebnisse.....	28
3.1 AKI-Gruppen.....	28
3.2 <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS).....	28
3.3 Quantifizierung der miRNAs mittels qPCR	29
3.4 Klinische Daten	34

3.4.1	Patientencharakteristika	34
3.4.2	Komorbiditäten.....	35
3.4.3	<i>STS-Score</i> und <i>Cleveland Clinic Score</i>	36
3.4.4	Volumenhaushalt.....	37
3.4.5	Laborparameter der Nierenfunktion	39
3.4.6	Transfusion	45
3.4.7	Hämodynamik.....	46
3.4.8	Kardiale Laborparameter	48
4	Diskussion	49
4.1	Diskussion der Methodik	50
4.1.1	Studiendesign	50
4.1.2	<i>Next Generation Sequencing (NGS)</i>	51
4.1.3	Methoden und verwendete qPCR	52
4.2	Ergebnisse	55
4.2.1	qPCR	55
4.2.2	TIMP-2 und IGFBP7 im Urin.....	60
4.2.3	Patientencharakteristika und Komorbiditäten	62
4.2.4	Volumenhaushalt.....	64
4.2.5	Laborparameter der Nierenfunktion	65
4.2.6	Transfusion	68
4.2.7	Hämodynamik und kreislaufwirksame Medikamente	70
4.2.8	Herzenzyme.....	71
5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	74
6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	76
	Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Acute Kidney Injury (AKI)

1.1.1 Definition und Einteilung

Die akute Nierenschädigung (engl.: *acute kidney injury*; AKI) geht mit einer akuten Funktionseinschränkung der Nieren bis hin zum Nierenversagen einher.

Definiert wird eine AKI als abrupt auftretende Abnahme der Nierenfunktion, die bis zum akuten Nierenversagen reichen kann [1]. Seit 2012 wird die Diagnose einer AKI nach der *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) Initiative als mindestens ein Anstieg des Serumkreatinins um $\geq 0,3$ mg/dl innerhalb von 48 Stunden, ein Anstieg des Serumkreatinins auf über das 1,5-fache des Ausgangswertes innerhalb der letzten 7 Tage oder eine Urinausscheidung von $<0,5$ ml/kg/h über mind. 6 Stunden definiert (AKI Grad 1) [1].

Eingeteilt wird die AKI nach der KDIGO-Definition in 3 Stadien (s. Tabelle 1): Sind die oben genannten Kriterien erfüllt, liegt mind. Stadium 1 vor. Sobald die Urinausscheidung über mehr als 12 Stunden $<0,5$ ml/kg/h beträgt oder das Serumkreatinin das 2 – 2,9-fache des Ausgangswertes erreicht, liegt Stadium 2 vor. In Stadium 3 liegt entweder ein Serumkreatinin von >4 mg/dl oder eine Erhöhung auf das 3-fache des Ausgangswertes vor oder es besteht eine Diurese von $<0,3$ ml/kg/h über mind. 24 Stunden bzw. eine Anurie über mind. 12 Stunden [1].

Grad	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dl (26,5 μ 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- 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 μ 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

Kriterien für die Einteilung in die drei AKI-Grade nach KDIGO. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, KDIGO = *Kidney Disease: Improving Global Outcome*, KG = Körpergewicht, eGFR = geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, mg = Mikrogramm, dl = Deziliter, μ mol = Mikromol, l = Liter, ml = Milliliter, kg = Kilogramm, h = Stunde

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz einer AKI wird je nach Studie sehr unterschiedlich angegeben. Dies liegt zum einen am ökonomischen Status der verschiedenen Länder und zum anderen an der bis vor einigen Jahren uneinheitlichen Definition einer AKI. Angegeben werden Prävalenzen zwischen <1% und 66%. [2]. Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer AKI lassen sich in patientenbezogene und expositionsbezogene Faktoren unterteilen (s. Tabelle 2). Zu ersteren zählen u. a. Volumenmangel, Alter, weibliches Geschlecht, chronisches Nierenversagen, chronische Herz-, Leber- oder Lungenerkrankungen, Diabetes Mellitus, Karzinome und genetische Faktoren. Zu letzteren zählen Sepsis, kardiochirurgische oder andere große operative Eingriffe, Kreislaufschock, kritische Erkrankungen, Verbrennungen, schwere Traumata, nephrotoxische Medikamente und Kontrastmittelgabe [3]. Darüber hinaus unterscheiden sich Inzidenz und Ursachen einer AKI auch zwischen Ländern mit eher hohem und eher niedrigem Durchschnittseinkommen, wobei Länder mit geringerem Durchschnittseinkommen eine höhere Inzidenz von AKI haben, was unter anderem an einer eingeschränkten Früherkennung und Therapiemöglichkeiten, aber auch an endemischen Krankheiten oder fehlendem Zugang zu sauberem Trinkwasser liegt [2].

Patientenbezogene Faktoren	Expositionsbezogene Faktoren
Dehydrierung / Volumenmangel	Sepsis
Hohes Alter	Kardiochirurgische Operationen
Weibliches Geschlecht	Kritische/schwere Erkrankungen
Dunkler Hauttyp	Kreislaufschock
Chronische Nierenerkrankung	Großflächige Verbrennungen
Andere chronische Erkrankungen	Trauma
Diabetes mellitus	Große Operationen
Krebserkrankung	Nephrotoxische Medikation
Anämie	Kontrastmittelgabe
	Pflanzen-/Tiergifte

Tabelle 2: Risikofaktoren für die Entwicklung einer AKI

Modifiziert nach [1].

Bei Patienten¹ in intensivmedizinischer Behandlung sind kardiochirurgische Operationen nach der Sepsis der zweithäufigste Grund für eine AKI, was vor allem vor dem Hintergrund der assoziierten Mortalität und Morbidität und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten eine hohe klinische Relevanz mit sich bringt [4]. Eine AKI tritt bei rund ein bis zwei Drittel der Intensivstations-Patienten auf, wovon 10-15% dialysepflichtig werden. Dabei ist der Trend sowohl bei der Inzidenz von AKI als auch beim Anteil der dadurch dialysepflichtigen Patienten aktuell zunehmend [2]. Jedes Jahr werden fast 2 Millionen Operationen am Herzen durchgeführt [4], wobei die Inzidenz einer AKI nach einer solchen Operation mit 8,9 bis 39% angegeben wird [5]. Diese weit gefasste Spanne ist auf unterschiedliche Eigenschaften der Patienten wie die oben genannten Risikofaktoren, die Art der durchgeführten OP und auf den Beobachtungszeitraum der jeweiligen Studien zurückzuführen [5]. Da die AKI bisher nicht ursächlich zu therapieren ist, liegt der Fokus vor allem auf der Prävention, bspw. durch Vermeidung von expositionsbezogenen Risikofaktoren (s. Tabelle 2). Mögliche Strategien zur Prävention wurden von Ostermann et al. 2021 zusammengefasst: Die Vermeidung einer Hypalbuminämie präoperativ zeigte eine bessere Diurese und ein verringertes Risiko für eine AKI. Außerdem sollten ACE-Hemmer, sonstige nephrotoxische Medikamente wie nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) oder bestimmte Antibiotika pausiert werden. Intraoperativ sollten ein individuelles Blutdruckziel, eine minimalinvasive extrakorporale Zirkulation mit biokompatibler Innenbeschichtung der Schläuche, lungenprotektive Beatmung und die Gabe von balancierter Vollelektrolyt-Lösung angestrebt werden [6]. Für das postoperative Setting werden die von der KDIGO vorgeschlagenen Maßnahmen zur AKI-Prävention angegeben. Zusammenfassend beinhalten diese eine engmaschige funktionelle und laborchemische Überwachung der Nierenfunktion, hämodynamisches Monitoring, eine Optimierung des Flüssigkeitshaushalts und des Kreislaufs, Vermeidung von Hyperglykämie und Vermeidung von Kontrastmittel und anderen nephrotoxischen Medikamenten [1, 6]. Die Vermeidung einer AKI spielt auch für die Reduktion langfristiger Folgeschäden anderer Organsysteme eine Rolle. So zeigten Odutayo et al. in einer Metanalyse von über 250.000 Patienten über verschiedene Studien, dass eine AKI langfristig mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Mortalität, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz zusammenhängt [7].

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit das generische Maskulinum (bspw. „Patienten“) gewählt, was sich jedoch immer zugleich auf weibliche und männliche Personen (bspw. „Patienten und Patientinnen“) bezieht.

Insgesamt liegen der Entwicklung einer AKI zahlreiche patienteneigene und expositionsbezogene Faktoren zugrunde, die es so weit wie möglich, gerade bei Patienten mit unveränderlichen patientenbezogenen Risikofaktoren, zu optimieren gilt. Durch die Entwicklung einer AKI zeigen betroffene Patienten eine erhöhte Mortalität und langfristig erhöhte Morbidität mit teils irreversiblen Folgeschäden [2] und stellen durch verlängerte Krankenhausaufenthalte auch eine erhebliche ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem dar [8].

1.1.3 Diagnostik

Aktuell wird eine AKI durch Untersuchung der Kreatininkonzentration im Serum und Urinausscheidungsmenge diagnostiziert. Eine Limitierung all dieser Parameter besteht jedoch darin, dass sie Marker der Nierenfunktion und nicht einer -schädigung sind. Sie steigen unspezifisch und nur verzögert an [3, 9]. Zwei weitere Parameter, die häufig zur Einschätzung der Nierenfunktion genutzt werden, sind die Serumharnstoffkonzentration und Cystatin C im Serum, auch wenn diese nicht als Kriterium für eine AKI nach KDIGO verwendet werden.

Das **Serumkreatinin** ist an zahlreichen verschiedenen intra- und extrarenalen Funktionen beteiligt. Es ist ein Stoffwechselprodukt, das in Muskelzellen gebildet und zur Ausscheidung frei in den Glomeruli filtrierte wird [10]. Die Konzentration von Kreatinin im Serum ist neben zahlreichen anderen Prozessen auch abhängig von der vorhandenen Muskelmasse [11]. Bei Erhöhung kann man nicht zwischen struktureller Organschädigung und funktionalen hämodynamischen Ursachen unterscheiden [9]. Aus dem Serumkreatinin kann die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) errechnet werden, die zur Abschätzung der Nierenfunktion herangezogen werden kann, eine gängige Formel ist z. B. die nach Cockcroft & Gault [12]. Die aus dem Serumkreatinin berechnete GFR zeigt eine tatsächliche Funktionseinschränkung der Niere aber oft erst verspätet an, was am sogenannten Kreatinin-blinden Bereich der Nierenschädigung liegt. Dabei ist bei einer Abnahme der echten GFR auf bis zu 60 mL/min/1.73 m² ein noch normwertiges Serumkreatinin möglich [13]. Dies liegt unter anderem an weiteren Einflussfaktoren auf den Serumkreatinin-Wert, die unabhängig von der GFR sind, wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht oder chronische Erkrankungen. Außerdem kann die Niere durch Hypertrophie gesunder Nephrons einen Ausfall von bis zu 50% des funktionellen Nierengewebes kompensieren, was zu einer weiteren Verschleierung einer eventuellen Nierenschädigung beitragen kann [14].

Die **Urinausscheidung** (Diurese) ist nicht nur von der Nierenfunktion selbst abhängig, sondern auch von einem ggf. vorhandenen Volumenmangel oder einer Diuretikatherapie [3].

Harnstoff im Serum ist ein Stoffwechselprodukt von stickstoffhaltigen Substanzen aus der Leber, welches über die Nieren ausgeschieden wird [15]. Eine Erhöhung im Serum kann auf eine verminderte Funktion der Niere hinweisen, allerdings ist die Serumkonzentration von Harnstoff auch abhängig von der Nahrungszufuhr, der Leberfunktion und vom Wasserhaushalt und kann daher nur im Zusammenhang mit anderen Laborwerten zur Einschätzung der Nierenfunktion genutzt werden [16].

Cystatin C ist eine von kernhaltigen Zellen produzierte Cystein-Protease, wird von den Glomeruli frei filtriert und komplett ins Tubulussystem rückresorbiert und abgebaut, ohne ausgeschieden zu werden. Die Serumkonzentration ist dadurch quasi ausschließlich abhängig von der glomerulären Filtrationsrate (GFR) [17]. Es ist jedoch im Urin unabhängig von der GFR nur bei tubulärer Dysfunktion zu finden. Gegenüber dem Kreatinin ist es zur Erkennung einer AKI überlegen, kann jedoch nicht zwischen chronischem und akutem Nierenversagen unterscheiden [18]. Bei Patienten nach kardiochirurgischen Operationen zeigte sich Cystatin C überlegen als frühzeitiger Marker für eine akute Nierenschädigung [19].

Ein neuer, spezifischer und von äußeren Einflüssen unabhängiger Biomarker wird schon seit einigen Jahren gesucht. Optimalerweise sollte ein Biomarker möglichst nicht-invasiv messbar sein, früh im Krankheitsverlauf detektierbar, prognostisch relevant und natürlich spezifisch für die untersuchte Erkrankung und von pathophysiologischer Bedeutung sein [20]. Durch eine frühzeitige Erkennung und Therapie, würden sich nicht nur Morbidität und Mortalität verringern, sondern auch die Komplikationen, die eine AKI mit sich bringt, sowie die ökonomische Belastung.

1.1.4 Neue Biomarker

Seit etwa zwanzig Jahren sind neue potenzielle Biomarker zur Diagnostik einer AKI in den Forschungsfokus gerückt, die im Urin oder Plasma messbar sind. In Studien evaluierte Marker sind u. a. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), Proenkephalin A 119-159 (PENK), *C-C motif chemokine ligand 14* (CCL14) und *tissue inhibitor of metalloproteinase 2* und *insulin like growth factor binding protein 7* (TIMP-2 x IGFBP7).

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) ist ein Protein, welches Teil des angeborenen Immunsystems ist. Durch die Bindung von Siderophoren (Eisenträgern) wirkt es bakteriostatisch, indem es die Eisenaufnahme von Bakterien inhibiert [21]. NGAL steigt

frühzeitig bei einer akuten Nierenschädigung an und ist ein starker prädiktiver Marker für eine AKI, noch bevor ein Funktionsverlust durch einen Anstieg des Serumkreatinin angezeigt wird [22, 23]. Vor allem bei schwerer AKI und Dialysepflichtigkeit im Zusammenhang mit kardiochirurgischen Operationen ist dies der Fall [24].

Ein weiterer aktuell erforschter Marker ist das **Proenkephalin A 119-159** (PENK), ein Peptid aus der Familie der Enkephaline, das frei glomerulär filtriert wird [25]. Enkephaline sind körpereigene Opioide, die u. a. im zentralen Nervensystem, Muskelzellen, Darm und Niere produziert werden und an Opioid-Rezeptoren binden. Diese kommen nicht nur im zentralen und peripheren Nervensystem, sondern auch an anderen Organen vor [26]. So findet sich die höchste Dichte an δ -Opioid-Rezeptoren in der Niere, was auf einen direkten Einfluss von Enkephalinen auf die Nierenfunktion hinweist [25, 27]. Dazu zeigten Shah et al. 2015, dass es bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen eine Korrelation zwischen erhöhtem PENK im Serum und der Entwicklung einer AKI gab [28]. Erhöhte PENK-Werte konnte in mehreren Studien eine AKI in verschiedenen Kohorten voraussagen und auch die Schwere der AKI korrelierte mit der Höhe der PENK-Konzentration im Serum [25].

Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 und **insulin like growth factor-binding protein 7** (TIMP-2 und IGFBP7) sind Proteine, die an der Inhibierung von Signalkaskaden beteiligt sind und werden als Reaktion bei entzündlich oder ischämisch bedingten DNA-Schäden vermehrt in den Nierentubulus-Zellen exprimiert [29]. Sie sind in der Frühphase solcher Schädigungen am G₁ Zellzyklusarrest der Nierenepithelzellen beteiligt [30]. Das Produkt aus beiden Proteinen (TIMP-2 x IGFBP7) wurde aus über 300 analysierten Biomarkern im Rahmen zweier multizentrischer Observationsstudien (Sapphire- und Opal-Studie) von Kashani et al. als wichtiger Biomarker zur Vorhersage einer AKI identifiziert [30]. Hierbei zeigte sich diese Kombination auch vielen anderen beschriebenen Biomarkern wie Cystatin C, NGAL und KIM-1 überlegen. Kashani et al. untersuchten 2013 in diesen zwei Multicenter-Observationsstudien zusammen mehr als 1200 kritisch kranke Patienten, die nach Sepsis, Schock, großen operativen Eingriffen oder Traumata eine AKI entwickelten und erstellten einen Risiko-Score für AKI. Dieser berechnet sich aus dem Produkt von TIMP-2 und IGFBP7 geteilt durch 1000 und wird ohne Einheit angegeben. Dabei zeigte sich bei Werten >0,3 ein steiler Anstieg des Risikos für eine AKI Grad 2 oder 3, Tod, Dialysepflichtigkeit oder permanente Nierendysfunktion innerhalb von 30 Tagen, bei Werten >2 verdoppelte sich dieses Risiko sogar. Dieser *cut-off* von >0,3 konnte auch von Bihorac et al. in der 420 kritisch kranke Patienten umfassenden prospektiven Topaz-Studie validiert werden [31].

Die Sensitivität des Produkts aus TIMP-2 und IGFBP7 betrug in den beiden Studien 92% und 76% für den *cut-off* bei 0,3. Der negative prädiktive Wert lag bei 96% und 88%, es wurden also die Patienten, die innerhalb von 12 Stunden eine AKI Grad 2 oder 3 entwickelten, zum Großteil auch positiv getestet, während Patienten mit einem negativen Testergebnis auch in der Regel kein erhöhtes Risiko für eine AKI hatten. Die Spezifität des Tests lag in den beiden Studien für den *cut-off* bei 0,3 bei 46% und 51% und der positive prädiktive Wert lag bei 27% und 31%. Das heißt, dass bei einem positiven Testergebnis (über 0,3) einer von vier bzw. einer von drei Patienten innerhalb von 12h eine AKI Grad 2 oder 3 entwickelt [30, 32]. Auch wenn diese Ergebnisse von Bell et al. nicht bestätigt werden konnten, konnten sie zeigen, dass die Konzentration von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin bei Diabetikern erhöht ist [33]. Die Messung der Konzentration von TIMP-2 x IGFBP7 im Urin kann aktuell schon zur Risikoabschätzung für eine AKI klinisch genutzt werden (s. Kapitel 2.4). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Grenzwert für das Produkt aus TIMP-2 * IGFBP7 bei 0,3 gewählt.

In aktuellen Forschungsarbeiten wurde das Zytokin **CCL14** als vielversprechender Marker für eine anhaltende schwere AKI identifiziert [34, 35]. In der RUBY-Studie zeigten Patienten, die erhöhte Konzentrationen von CCL14 im Urin aufwiesen, signifikant häufiger eine anhaltende schwere AKI (Stadium 3 nach KDIGO über mind. 72 h) [34]. Dabei war das Risiko für eine anhaltende AKI größer, je höher der Wert von CCL14 im Urin war, was auch in einer Folgestudie bestätigt werden konnte [34, 36].

All diese Biomarker zeigen nichtsdestotrotz einzelne Schwächen, da sie teilweise nicht spezifisch genug für eine AKI sind, eher aufwendige Methoden benötigen, nicht allseits verfügbar sind oder bei anderen Erkrankungen erhöht sein können. Auch wenn teils vielversprechende Ergebnisse in verschiedenen Studien gezeigt werden konnten (s. o.), wurde der optimale Biomarker für eine AKI also noch nicht gefunden. Hier könnten sogenannte Mikroribonukleinsäuren (engl. *micro ribonucleic acid*, MicroRNA, miRNA) interessant sein und möglicherweise einige dieser Schwächen im Bereich neuer Biomarker beseitigen.

1.2 MicroRNAs

1.2.1 Funktion

Entgegen der früheren Ansicht, dass die meisten Gene im menschlichen Genom Proteine kodieren, weiß man heute, dass dies nur für etwa 2% der Fall ist. Ungefähr 80% unserer Gene werden zwar in RNA umgeschrieben, die meisten davon erfüllen aber keine kodierenden, sondern regulierende Aufgaben [37]. Teile dieser nicht-kodierenden RNAs (*non-coding RNAs*;

ncRNAs) erfüllen gemeinsam mit den kodierenden mRNAs Aufgaben bei der Proteinsynthese, die meisten agieren jedoch als regulierende Gene und werden ihrer Länge nach in weitere Kategorien unterteilt (s. Abb. 1): ncRNAs mit über 200 Basenpaaren werden als *long non-coding RNAs* (lncRNAs) bezeichnet, ncRNAs mit weniger als 200 Basenpaaren als *small non-coding RNAs* (sncRNAs). Letztere beinhalten neben mehreren anderen RNA-Untergruppen als aktuell intensiv erforschte Untergruppe die MicroRNAs (miRNAs) [3].

MiRNAs repräsentieren 1% der menschlichen Gene [38]. Sie sind ca. 20-23 Nukleotide lang, kommen endogen vor, sind nicht-kodierende RNA-Fragmente und regulieren die Genexpression posttranskriptionell, indem sie die Proteintranslation inhibieren. Sie kommen stabil im Plasma sowie im Urin vor, wodurch sie sich gut zur laborchemischen Diagnostik eignen. Es ist bekannt, dass verschiedene miRNAs mit erhöhter Abundanz in bestimmten Geweben vorkommen (bspw. miR-1 im Herzmuskel- und miR-122 im Lebergewebe) und gelten als vielversprechender Biomarker zur Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen. Sie sind außerdem durch spezifische Antagonisten oder Agonisten (sogenannte *mimics*, Imitatoren) beeinflussbar, was einen potenziellen therapeutischen Nutzen möglich erscheinen lässt [3, 9].

Die erste miRNA namens *lin-4* wurde 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt. Bis heute wurden ca. 2600 reife miRNAs im Menschen identifiziert [39]. Die RNA-Polymerase II synthetisiert Primärtranskripte, sog. *pri-miRNAs*, die durch das Enzym *Drosha-DGCR8* in doppelsträngige prä-miRNAs gespalten werden. *Exportin 5* transportiert diese aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo sie durch die Ribonuklease *Dicer* in 20-23 Nukleotide lange doppelsträngige RNA-Fragmente (reife miRNAs) gespalten werden. Ein einzelner Strang, meist der Leitstrang, wird zusammen mit anderen Proteinen in den sog. *RNA induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Der RISC ist in der Lage *messenger RNA* (mRNA) an ihrem nicht translatierten Bereich (3'-UTR, *untranslated region*) zu binden und führt zur Inhibierung der Proteintranslation oder zum Abbau jener mRNA [3].

Vermutlich werden über 60% aller mRNAs durch miRNAs reguliert, da jede miRNA im Schnitt an mehr als 100 verschiedene mRNAs bindet [40, 41].

Es gibt eine Vielzahl an nicht-kodierenden RNAs, die in verschiedenen Zellen und Geweben vorkommen und Einfluss auf Transkription und Translation nehmen. Dadurch sind sie auch anfällig für pathognomische Mutationen und tragen vermutlich zur Entstehung und zum Verlauf von Krankheiten bei [42].

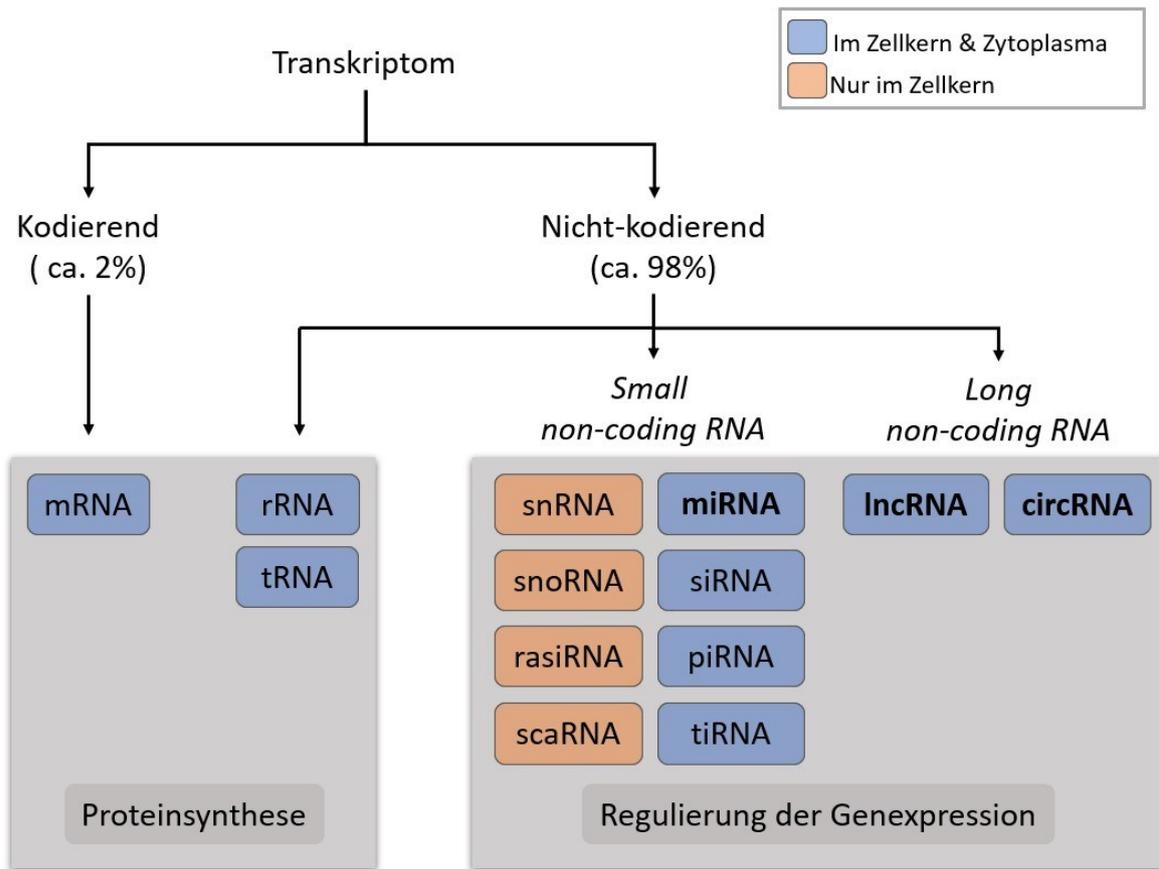


Abb. 1: Zusammensetzung des menschlichen Transkriptoms

Zusammensetzung des menschlichen Transkriptoms mit Unterteilung in die verschiedenen RNA-Untergruppen, modifiziert nach [3]. Die RNAs können nach Funktion, Vorkommen in der Zelle und Größe eingeteilt werden. RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, rRNA = ribosomale RNA, tRNA = Transfer-RNA, snRNA = small nuclear RNA, snoRNA = small nucleolar RNA, rasiRNA = repeat associated small interfering RNA, scaRNA = small Cajal body specific RNA, miRNA = MicroRNA, siRNA = small interfering RNA, piRNA = piwi-interacting RNA, tiRNA = transfer RNA-derived stress-induced small RNA, lncRNA = long noncoding RNA, circRNA = circular RNA.

1.2.2 Beteiligung von miRNAs an verschiedenen pathologischen Prozessen

Bisher wurde eine Vielzahl an lncRNAs und insbesondere an miRNAs als potenzielle diagnostische Marker für verschiedenste Krankheitsbilder erforscht. Darüber hinaus scheinen sie auch bei der Entwicklung und Differenzierung von Geweben eine Rolle zu spielen.

Beispielsweise zeigten Chen et al. im Tierversuch, dass miR-133 bei der Entwicklung von Muskelzellen eine entscheidende Rolle spielt und mit anderen bekannten Transkriptionsfaktoren interagiert. Eine Inhibierung von miR-133 bewirkte im Experiment eine Steigerung der Myogenese, jedoch wurde die Differenzierung der Muskelzellen gleichzeitig unterdrückt [43]. Bonnet et al. fassten 2020 zusammen, welche miRNAs bei Erkrankungen von Herz, Lunge und Skelettmuskulatur, die meist in Kombination mit anderen Krankheiten wie Herzinsuffizienz, pulmonaler Hypertension und Myopathien auftreten, eine wichtige Rolle

spielen [42]. In ihrer Übersichtsarbeit zeigen sie zahlreiche microRNAs auf, die für den Verlauf verschiedenster Krankheitsbilder wahrscheinlich mit verantwortlich sind oder für Diagnostik und Prognose relevant werden können.

MiRNAs spielen folglich auch bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen eine Rolle und können Endorganschäden anzeigen. Beispielsweise konnten van Caster et al. 2014 zeigen, dass im in vivo Rattenmodell eine Ischämie mit Reperfusion mit einer erhöhten Freisetzung von miR-122 aus dem Lebergewebe einherging, ohne dass die Expression von miR-122 im Lebergewebe erhöht war. Dies korrelierte auch mit erhöhten Laborparametern der Leber im Serum [44].

Neben den diagnostischen Möglichkeiten gab es auch Ansätze zur Therapie von Hepatitis C mit miRNAs. In einer 2013 durchgeführten Zulassungsstudie in der Phase 2a von Janssen et al. erhielten 36 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion ein modifiziertes DNA-Phosphorothioat *antisense*-Oligonukleotid (Miravirsin), welches die miR-122 bindet und damit inhibiert. Dabei konnte eine dosisabhängige deutliche Reduktion der Viruslast bis teils unterhalb der Nachweisgrenze gezeigt werden, die auch noch Wochen nach den Medikamentengaben anhielt [45]. Trotz dieser anfangs vielversprechenden Ergebnisse hat sich dieser Ansatz in der klinischen Anwendung, unter anderem wegen potenzieller Nebenwirkungen, welche die Bildung von Leber-Karzinomen begünstigen könnten, bisher nicht etabliert [46].

Ein aktuelles Beispiel für den therapeutischen Ansatz bei miRNAs ist die antimir-132, ein *antisense*-Oligonukleotid, das an die miR-132 bindet und so fibrotische Prozesse im Rahmen einer Herzinsuffizienz verhindert [47]. In Versuchen an Mäusen und Schweinen konnte die Wirksamkeit dieses Ansatzes über verschiedene Signalwege gezeigt werden, wobei keine Nebenwirkungen im Tiermodell auftraten [47, 48]. In einer klinischen doppelt verblindeten Interventionsstudie konnten diese Ergebnisse auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bestätigt werden [49]. Aktuell läuft eine Phase-2-Studie zur weiteren Evaluation einer klinischen Anwendung der antimir-132 an Patienten mit Herzinsuffizienz nach Herzinfarkt [50].

Auch bei Neoplasien gibt es Hinweise auf den Einfluss von miRNAs. So zeigten Huang et al, dass bei bestimmten T-Zell-Lymphomen die Expression von miR-10a und miR-342-3p verringert war im Vergleich zu gesunden Zellen. Gleichzeitig waren die Oberflächen-Rezeptoren für diese miRNAs auf den betroffenen Zellen erhöht. Huang et al. schlossen daraus, dass diese miRNAs im Zusammenhang mit der veränderten Expression ihrer Rezeptoren zur Entstehung dieser Art

von T-Zell-Lymphom beitragen [51]. Auch ein therapeutisches Eingreifen mittels miRNAs scheint hier möglicherweise in der Zukunft zu liegen.

Neben den hier aufgeführten Beispielen gibt es noch zahlreiche Organsysteme und Pathologien, die aktuell im Zusammenhang mit miRNAs erforscht werden. Dies zeigt die steigende Bedeutung und das erhoffte hohe Potential von miRNAs für Diagnostik und Therapie unterschiedlichster Krankheiten.

1.2.3 MicroRNAs bei AKI

Es gibt bereits viele Studien zu miRNAs im Zusammenhang mit AKI sowohl am Tiermodell als auch in klinisch-experimentellen Studien am Menschen. Brandenburger et al. fassten einige wichtige Studien der letzten Jahre zu diesem Thema zusammen[3].

Die erste Studie, die den Effekt von miRNAs auf eine AKI untersuchte, wurde 2010 von Wei et al. veröffentlicht. Sie konnten zeigen, dass eine Unterbrechung der miRNA-Signalkette in proximalen Tubulus-Zellen in Mäusen zu einer besseren Nierenfunktion und weniger Gewebeschaden nach Ischämie führte [52]. Eine der am häufigsten im Zusammenhang mit einer AKI untersuchten miRNAs ist miR-21. Sie wird in zahlreichen Organen exprimiert, ist unter anderem an Prozessen der Apoptose, Entzündung und Fibrose der Niere beteiligt und scheint bei Dysregulation im Maus-Modell auch an der Pathogenese einer AKI involviert zu sein [3, 53]. Chen et al. zeigten 2016, dass die Konzentration von miR-16 im Urin ein signifikanter Biomarker zur Erkennung einer AKI sein kann und dass miR-16 wahrscheinlich eine wichtige Rolle in einer AKI nach Ischämie/Reperfusion spielt. Im Maus-Modell stieg die miR-16 bereits vor den klassischen Markern wie Kreatinin bei AKI an [54]. MiR-24 konnte von Lorenzen et al. als relevanter Apoptose-Mediator in renalen Endothel- und Tubulus-Zellen identifiziert werden. So resultierte eine Inhibierung der miR-24 in Mäusen nach Ischämie der Nieren mit einer verbesserten Mortalität und Nierenfunktion [55]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Wilflingseder et al. 2014 mit der miR-182-5p. Wenn diese in einem Ratten-Modell einer AKI inhibiert wurde, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine verbesserte Nierenfunktion, was auch die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes in Aussicht stellt [56]. Eine weitere Studie, die therapeutische Möglichkeiten im Tiermodell demonstriert wurde 2022 von Aomatsu et al. durchgeführt. Sie analysierten im Mausmodell die Expression von miRNAs nach durch Ischämie-Reperfusions-Schädigung induzierter AKI und identifizierten die miR-5100 als relevanten Marker. Wenn eine künstlich hergestellte miR-5100 in die Mäuse intravenös injiziert wurde, zeigten sie signifikant seltener eine AKI nach Ischämie-Reperfusions-Schädigung [57].

Auch beim Menschen wurden schon mehrere Studien zu miRNAs im Zusammenhang mit AKI durchgeführt. So identifizierten Aguado-Fraile et al. zehn verschiedene miRNAs, die im Serum von Patienten mit AKI im Vergleich mit nierengesunden Probanden signifikant unterschiedlich exprimiert wurden und als Biomarker fungieren könnten [58]. Die miR-21 ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz herunterreguliert [59] und konnte als präoperativer Marker in einer Studie von Gaede et al. vorhersagen, ob Patienten nach einer kardiochirurgischen Operation eine AKI entwickeln [60]. Außerdem wurde die miR-210 2011 von Lorenzen et al. als unabhängiger Prädiktor für das 28-Tage-Überleben kritisch kranker Patienten, darunter auch Patienten nach kardiochirurgischen Operationen, identifiziert [61]. 2020 konnten Liu et al. die Ergebnisse aus ihrem Tiermodell zur miR-452 an Sepsis-Patienten reproduzieren. Dabei war eine Verdopplung der gemessenen Konzentration von miR-452 im Urin mit einem über 72-fach erhöhten AKI-Risiko vergesellschaftet [62].

1.3 Ziele der Arbeit

In dieser Dissertation habe ich untersucht, ob die MicroRNAs miR-1, miR-21-5p und miR-29c-3p bei kardiochirurgischen Patienten postoperativ als frühe Biomarker für eine AKI geeignet sind. Dazu wurden Veränderungen der Plasmakonzentration der miRNAs mittels qPCR untersucht und mit einem bereits etablierten *Bedside-Test* zur frühen Risikoeinschätzung für die Entstehung einer AKI verglichen.

Da die Entstehung einer AKI nach herzchirurgischen Eingriffen von zahlreichen Faktoren abhängt, wurden zusätzlich patienten- und eingriffsspezifische Faktoren analysiert. Diese habe ich dahingehend ausgewertet, welche patienteneigenen Ausgangsmerkmale und perioperative Faktoren die Entwicklung einer AKI positiv oder negativ beeinflussen, was Angriffspunkte für präventive Strategien aufzeigen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Für die Teilnahme an der MiRAKI-Studie wurden präoperativ 155 Patienten ausgewählt, die sich einer herzchirurgischen Operation unterzogen, von denen nach Anwendung der Ausschlusskriterien 148 in die Studie eingeschlossen wurden. Vom gesamten eingeschlossenen Patientenkollektiv wurden demographische Daten erhoben und zu verschiedenen Zeitpunkten Blut- und Urin-Proben abgenommen sowie verschiedene Laborparameter erhoben. Als Referenz wurden die Patienten in die AKI-Stadien entsprechend der KDIGO-Kriterien eingeteilt (vgl. 1.1.1). Um zu überprüfen, ob microRNAs als neue Biomarker zur Früherkennung einer AKI geeignet sind, wurde als Vergleich ein bereits klinisch etablierter Bedside-Test zur Risikoabschätzung für eine AKI angewendet. Außerdem wurden Blutproben von je sechs Patienten mit und ohne AKI mittels *next generation sequencing* (NGS) auf Unterschiede bezüglich der Verteilung und Menge an MicroRNAs untersucht. Die gesammelten Proben wurden mittels quantitativer PCR analysiert und die gesammelten Labor- und Patientendaten wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ausgewertet.

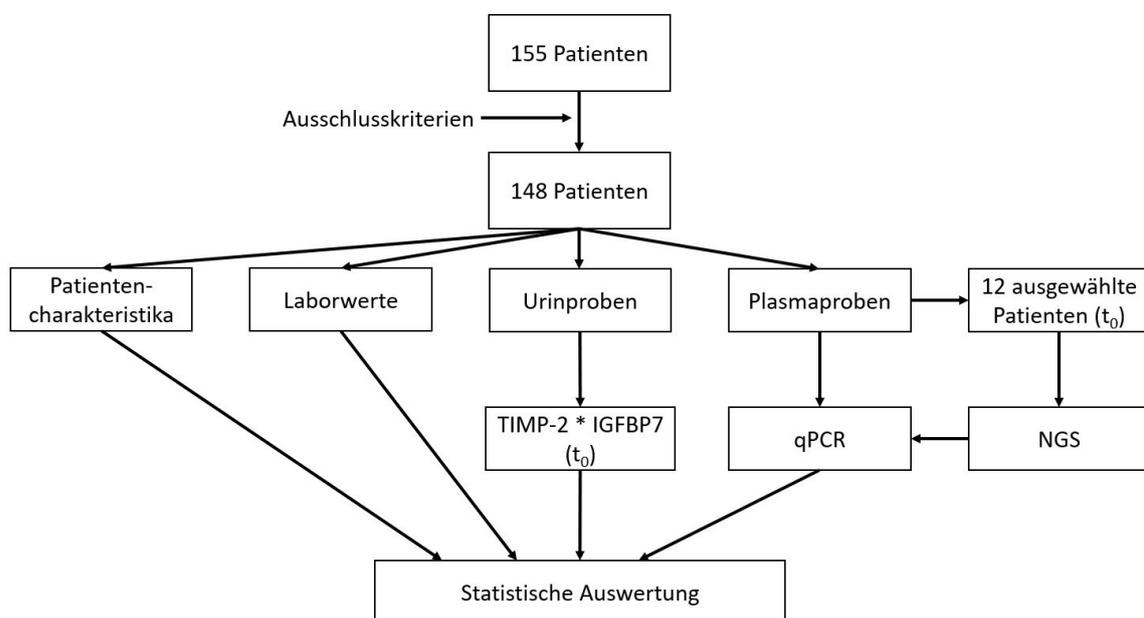


Abb. 2: Aufbau der MiRAKI-Studie

t_0 = bei Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, TIMP-2 = *Tissue inhibitor of metalloproteinase 2*, IGFBP7 = *Insulin-like growth factor-binding protein 7*, qPCR = *quantitative polymerase chain reaction*, NGS = *next generation sequencing*

2.1.1 Ein-/Ausschlusskriterien

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

In die Studie wurden insgesamt 155 Patienten zwischen 18 und 90 Jahren eingeschlossen, die sich einer kardiochirurgischen Operation unterzogen und zuvor persönlich oder durch einen gesetzlichen Betreuer bzw. eine bevollmächtigte Person schriftlich eingewilligt hatten.

Als Ausschlusskriterien wurden vor Beginn der Patientenrekrutierung definiert:

- eine Teilnahme an einer anderen klinischen Studie parallel zur MiRAKI-Studie oder innerhalb des letzten Monats
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- präexistierendes dialysepflichtiges chronisches Nierenversagen
- stattgehabte Dialyse innerhalb der letzten drei Monate
- Patienten auf der Organspende- oder Kunstherz-Warteliste
- stattgehabte Nierentransplantation
- präoperativer Einsatz eines extrakorporalen Organersatzverfahrens wie ECMO (extrakorporale Membranoxygenierung), ECLS (*extracorporeal life support*, extrakorporale Lebensunterstützung), RVAD (*right ventricular assist device*, Rechtsventrikuläres Unterstützungssystem) oder IABP (Intraaortale Ballonpumpe)
- eine präoperative GFR (glomeruläre Filtrationsrate) von unter 30 ml/min/1,73m²
- eine bekannte Nierenarterienstenose
- Kontraindikationen gegen die Entnahme einer 8-ml-Blut- bzw. Urinprobe.

Insgesamt wurden anhand dieser Kriterien sieben Patienten von der Studie ausgeschlossen. Zwei Patienten starben vor t_0 , einer vor t_{24} , einer erhielt statt einer Operation einen interventionellen Eingriff, einer ein künstliches Herz, ein Patient hatte eine HIV-Infektion und bei einem Patienten war keine Blutabnahme an $t_{prä}$ erfolgt.

2.1.2 Probenentnahmen

Als Untersuchungsmaterial dienten Plasma- und Urinproben. Die Probenentnahmen fanden zu vier Zeitpunkten statt:

- Zeitpunkt $t_{\text{prä}}$: unmittelbar präoperativ (kurz nach Einleitung der Narkose)
- Zeitpunkt t_0 : bei Ankunft auf der Intensivstation (ca. drei bis fünf Stunden nach potenzieller Nierenschädigung bzw. Hypoperfusion durch die Operation)
- Zeitpunkt t_{24} : 24 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation
- Zeitpunkt t_{72} : 72 Stunden nach Ankunft auf der Intensivstation.

Bei jeder Probenentnahme wurden 8 ml EDTA-Blut, sofern vorhanden, aus einem arteriellen Katheter oder aus einem einliegenden zentralvenösen Katheter (ZVK) und 8 ml Urin aus einem Harnblasenkatheter entnommen. Unmittelbar nach jeder Blut- und Urinprobenentnahme wurden die Proben für fünf Minuten bei 3500 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand in 1,5 oder 2 ml fassende, sterile und DNase-/RNase-freie (Desoxy-/Ribonuklease-freie) Mikroreaktionsgefäße pipettiert und zunächst bei -20°C aufbewahrt und schnellstmöglich zur weiteren Lagerung bei -80°C in das Labor der experimentellen Anästhesiologie auf dem Campus der Heinrich-Heine-Universität überführt.

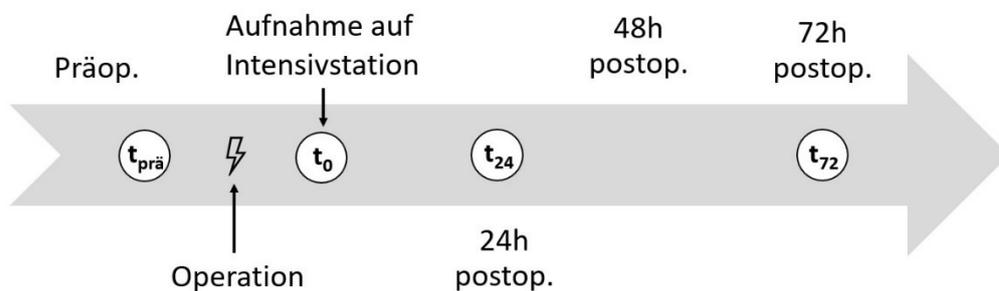


Abb. 3 Zeitpunkte der Probenentnahmen

Zeitleiste für die Probenentnahmen (eingekreist) im Rahmen der MiRAKI-Studie. Präop. = präoperativ, postop. = postoperativ, h = Stunden, t_0 = Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, $t_{24}/t_{48}/t_{72}$ = 24/48/72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ.

2.1.3 Case report form (CRF)

Zur schriftlichen Dokumentation aller klinischen Daten, wurde eine pseudonymisierte Datentabelle (engl. *case report form*, CRF) angelegt. In diese wurden wichtige Daten wie z. B. Geschlecht, OP-Art und -Dauer, Medikamente und Laborwerte von jedem Patienten eingetragen und als Grundlage für die statistische Auswertung verwendet. Diese Daten wurden verschiedenen Arztbriefen, OP-Protokollen, Patientenkurven von der Intensiv-, als auch von der Normalstation und dem Dokumentationsprogramm der Klinik entnommen.

Zur weiteren präoperativen Einschätzung des perioperativen Risikos für eine AKI wurden für jeden Patienten der *Cleveland Clinic Score* und der Risikoscore der *Society of thoracic surgeons* (*STS-Score*) erhoben.

Beide *Scores* dienen der Risikoidentifizierung für ein postoperatives dialysepflichtiges Nierenversagen speziell nach kardiochirurgischen Operationen. Der *Cleveland Clinic Score* teilt anhand verschiedener Risikofaktoren den Patienten in eine von vier Kategorien ein. Je höher die Kategorie, desto höher das Risiko für eine postoperative Dialysepflichtigkeit, die Gruppen wurden anhand eines je signifikant erhöhten Risikos bei Vorliegen entsprechend vieler Risikofaktoren gewählt. Hierbei erstreckt sich das Risiko in den Gruppen von 0,4 % bis 21,5 % [63]. Die Validität des Tests konnte auch in einer direkten Vergleichsstudie mit anderen entsprechenden Risiko-Scores gezeigt werden, daher eignet sich der *Cleveland Clinic Score* als Instrument, um die präoperative Risikoidentifizierung von Patienten zu untersuchen [64].

Der *STS-Score* dient der Berechnung der perioperativen Mortalität und Morbidität anhand verschiedener patienten- und operationsbezogener Parameter. In dieser Forschungsarbeit wurden insbesondere die Berechnung der Mortalität sowie der Morbidität für AKI und Apoplex beobachtet. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung und -eingabe wurde der *Society of Thoracic Surgeons Cardiac Surgery Risk Models score* von 2017 verwendet [65, 66], eine neuere Version des Risikorechners wurde nicht berücksichtigt.

2.2 *Next generation sequencing* (NGS)

In Kooperation mit der Firma Exiqon wurden zur kompletten Sequenzierung und Quantifizierung der in den Blutproben enthaltenen miRNAs zufällig sechs Patienten ausgesucht, die an AKI Grad 2-3 erkrankt waren und sechs gesunde Patienten mit jeweils ähnlicher Eingriffsart, OP-Dauer, Alter, Geschlecht, usw. Alle sequenzierten miRNAs wurden analysiert hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds zwischen der Gruppe ohne AKI und der Gruppe mit AKI Grad 2-3.

Ziel einer solchen differentiellen Expressionsanalyse ist es, Gene oder, wie für diese Studie, miRNAs aufzuzeigen, deren Expression sich zwischen den beiden untersuchten Proben Gruppen signifikant unterscheidet [67]. Die Quantifizierung einzelner RNAs kann durch eine RNA-Sequenzierung durchgeführt werden. Dabei wird beobachtet, wie oft ein bestimmtes RNA-Stück während einer Sequenzierungsreaktion gelesen wird (sog. Anzahl der *reads*). Zur Analyse der Daten einer RNA-Sequenzierung müssen diese erst normalisiert werden, da „die Stärke des

beobachteten Signals häufig von technischen Bedingungen beeinflusst wird und deshalb nicht ohne Weiteres zwischen verschiedenen Proben übereinstimmt“ [68].

Laut Exiqon wurde als Instrument das nextSeq500 verwendet und jede Probe zehn Millionen Mal bei einer durchschnittlichen Leselänge von 75 Nukleotiden gelesen. Die Plattform Illumina wurde zur Erstellung einer Bibliothek verwendet sowie das Protokoll QIAseq miRNA *Library Kit* von Qiagen. Zur differentiellen Expressionsanalyse kam die Software *EdgeR* von Bioconductor mit Verwendung der TMM-Normalisierungsmethode (*trimmed mean of M-values*) zum Einsatz [69], um biologische von technischen Variationen zu unterscheiden.

In der Ergebnistabelle des Kooperationspartners werden neben dem TMM für die aufgeführten miRNAs auch der Wert des logarithmischen *fold change* (logFC), der p-Wert und die *false discovery rate* (FDR) aufgeführt (s. Tabelle 10).

Der *fold change* ist ein Wert, der die relative Expression zweier RNA-Proben zueinander beschreibt [70]. In dieser Studie beschreibt er z. B. den Unterschied in der RNA-Expression von Proben von Patienten mit AKI im Vergleich zu Patienten ohne AKI. In statistischen Auswertungen wird häufig der Logarithmus des *fold change* (logFC) verwendet, welcher auch als *M-Value* bezeichnet wird [71].

Die *false discovery rate* (FDR) ist ein Maß für den Anteil an falsch-positiven Ergebnissen an allen Testergebnissen und wurde erstmals durch Benjamini und Hochberg 1995 beschrieben [72]. Sie dient zur Einschätzung der Signifikanz der relativen Expression. *Fold changes* mit angepassten p-Werten (FDR-Werten) <0,05 können im Allgemeinen als signifikant angesehen werden und haben eine erhöhte Chance, durch eine qPCR validiert zu werden.

2.3 Quantifizierung der miRNAs

Um die microRNAs in vitro nachzuweisen, haben wir das gängige Verfahren der quantitativen PCR (*polymerase chain reaction*) verwendet.

Allgemein dient eine PCR dazu, DNA-Fragmente zu vermehren. Hierfür wird die Vorlage, das *template*, im Probenansatz bei 92-96°C denaturiert, damit diese als Einzelstrang vorliegt. Im nächsten Schritt, dem *annealing*, binden bei niedrigerer Temperatur (in der Regel zwischen 50 und 66°C) Primer an komplementäre Sequenzen des DNA-Einzelstrangs und liefern damit die Ausgangsbedingung für den dritten Schritt der PCR, die Polymerisierung. Hierbei synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase ausgehend vom Primer einen Komplementärstrang aus den ebenfalls im Versuchsansatz vorhandenen Nukleotiden (dNTPs). Diese drei Schritte werden

mehrfach wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der vorhandenen DNA-Fragmente kommt [73, 74].

Bei der in dieser Forschungsarbeit angewendeten cDNA-Synthese (s. Kapitel 2.3.2) handelt es sich um eine *reverse transcription* (RT), bei der eine Transkriptase verwendet wird, die aus einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Diese gewonnene komplementäre DNA (cDNA) kann dann für die quantitative PCR (qPCR) im nächsten Versuchsabschnitt verwendet werden (s. 2.3.4)

Bei der angewendeten qPCR handelt es sich um eine *real time PCR*, da in Echtzeit nach jedem Synthese-Schritt mittels eines Fluoreszenz-Farbstoffs (SYBR Green) die Menge an vorhandenem PCR-Produkt gemessen wird. Je stärker die Fluoreszenz wird, desto höher ist die Menge an vorhandenem PCR-Produkt/DNA. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz durch die exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts von der vorhandenen Hintergrund-Fluoreszenz abhebt, wird als *threshold cycle* (C_t) bzw. *quantification cycle* (C_q) bezeichnet. Je niedriger dieser C_t -Wert ist, desto früher tritt eine exponentielle Vermehrung des *templates* ein und desto höher ist entsprechend die zu Beginn vorhandene Menge im Versuchsansatz [75].

Bei der in dieser Forschungsarbeit verwendeten qPCR handelt es sich um eine neuartige und leicht abgewandelte Form, die im Zuge einer Studie von Benes et al. entwickelt wurde: die miQPCR (MicroRNA-spezifische quantitative PCR). Diese flexible und kostengünstige Methode soll zahlreiche Vorteile mit sich bringen: Die universelle Elongation und Transkription aller microRNAs, die Möglichkeit eigene Primer mit einstellbaren Schmelztemperaturen (*melting temperature*, T_m) für jede mögliche miRNA zu erstellen und eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Unterscheidung ähnlicher miRNA-Sequenzen, sowie die Anwendung für freie und exosomal vorliegende miRNAs [76].

Für die miQPCR wird bei der cDNA-Synthese ein universeller Adapter, der miLINKER, an das 3'-Ende der miRNA gebunden, über den der Universalprimer (mq-RT) binden kann und den Startpunkt für die Polymerisation der cDNA vorgibt. Im qPCR-Ansatz kann dann der universelle Primer Upm2A an die komplementäre Stelle des mq-RT Primers binden und so den Ausgangspunkt für die Polymerisation während der qPCR bilden. Der große Vorteil gegenüber konventionellen qPCR-Verfahren ist hier die Möglichkeit, Primer zu erstellen, deren Schmelztemperatur variiert werden kann, bis sie im optimalen Temperaturbereich für die PCR liegt (55-62°C). Hierfür kann bei zu niedriger T_m des Primers eine Verlängerung am 3'-Ende des Primers komplementär zur Sequenz des miLinker oder bei zu höher T_m eine Verkürzung des Primers am 5'Ende vorgenommen werden [76].

2.3.1 RNA-Isolierung

Die RNAs wurden mit dem *miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (50)* von Qiagen nach einem modifizierten Protokoll aus den Proben isoliert. Hierzu wurden die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut und erneut zentrifugiert bei 16.000 G und 4°C für 10 Minuten, um größere extrazelluläre Fragmente, die noch zellfreie Nukleinsäuren enthalten, vollständig zu entfernen. 200 µl Überstand wurden dann in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben, mit 60 µl RPL-Puffer aus dem Kit versetzt und mittels Vortexmischer vermischt, was zur Zelllyse und Denaturierung von Proteinen und Ribonukleasen (RNAsen) führt [77]. Nachdem die Proben 3 Minuten bei Zimmertemperatur standen, wurden 5 µl der miRNA *C. elegans-miR-39* (5 fmol/ml, cel-miR-39) als Normierungs-Kontrolle für die spätere qPCR in die Proben gemischt. Synthetisch hergestellte miRNAs, insbesondere die cel-miR-39, werden oftmals als interne Kontrolle verwendet, um die in der PCR erzielten C_t -Werte für die verschiedenen Proben dadurch entweder untereinander oder mit denen einer Standardkurve zu vergleichen [77]. Als nächstes wurden dann 20 µl RPP-Puffer hinzugegeben und für 20 Sekunden mit einem Vortexmischer durchmischt und für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation für drei Minuten bei 12.000 rpm und 4°C, um im Plasma vorhandene Inhibitoren wie Proteine vom Überstand zu trennen, wurden 210 µl des klaren Überstandes in neue Mikroreaktionsgefäße gegeben und mit derselben Menge an reinem Isopropyl-Alkohol versetzt und erneut mit dem Vortexmischer vermischt, um die mind. 18 Nukleotide langen Moleküle in einen geeigneten Bindungszustand zu versetzen. Dann wurden die gesamten Proben jeweils in eine *RNeasy® UCP MinElute® Spin Column* (Säulen-Mikroreaktionsgefäß) gegeben und bei 8.000 rpm für 15 Sekunden bei 4°C zentrifugiert, sodass die RNA in der Membran der Säule gebunden werden konnte. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und in die Säule 700 µl RWT-Puffer aus dem *Kit* hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde wieder bei 8.000 rpm für 15 Sekunden und 4°C zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Dieser Schritt wurde mit 500 µl RPE-Puffer aus dem *Kit* wiederholt. Anschließend wurden 500 µl 80%iger Ethanol in die Säule gegeben und bei 8.000 rpm für 2 Minuten bei 21°C zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Kontaminationen endgültig auszuwaschen, und der abzentrifugierte Überstand verworfen. Nun wurden die Säulen in neue Mikroreaktionsgefäße gestellt und erneut bei 21°C und 16.000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, um die RNA in der Membran zu trocknen. Dann wurden die Säulen in neue 1,5 ml-Röhrchen gestellt und für 15 Minuten unter einem Abzug mit offenem Deckel

luftgetrocknet. Abschließend wurden 22 µl RNase-freies Wasser in die Säulen gefüllt und bei 16.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die 20 µl Durchfluss (das Totvolumen der Säule beträgt 2 µl) wurden erneut vorsichtig in die Säule pipettiert und die Zentrifugation wiederholt, um die RNA aus der Membran zu lösen. Die erhaltenen 18 µl RNA-Proben wurden in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen bei -80°C bis zur Durchführung der cDNA-Synthese und qPCR gelagert.

2.3.2 cDNA-Synthese

Da eine Veränderung der Konzentration der drei oben genannten, spezifisch ausgewählten miRNAs im Blut perioperativ untersucht werden sollte, wurde eine **MicroRNA-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (miQPCR)** nach dem Protokoll von Benes et al. (2015) durchgeführt [76].

Um die isolierte RNA für die miQPCR zu verwenden, musste sie zuerst in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Als erstes wurden dafür 8 µl der isolierten RNA in 200 µl PCR-Reagenzgefäße pipettiert und der *Tailing Mix* (T1) hergestellt. Dieser besteht pro umgeschriebene Probe aus 1,8 µl 10X Reaktions-Puffer von NEB, 0,2 µl Magnesiumdichlorid (450mM) von Invitrogen, 6,2µl PEG 8000 #B1004A (50%) von NEB, 0,2 µl miLinker (15µM, freundlicherweise von Dr. rer. nat. M. Castoldi bereitgestellt), 0,2 µl RNase Inhibitor (40U/µl) von Invitrogen und 0,2 µl T4-RNA-Ligase 2 (200U/µl) von NEB. Zur Elongation wurden 8 µl des *Tailing Mixes* (T1, s. Tabelle 3) der Probe hinzugefügt, die Proben in den Reagenzgefäßen zentrifugiert und für 30 Minuten bei 25°C inkubiert und danach auf 10°C gekühlt. In dieser Zeit wurden der *Tailing Mix* 2 und 3 hergestellt.

<i>Tailing Mix</i> 1 (T1)	Volumen (µl)
10X <i>Reaction Buffer</i> (NEB)	1,8
MgCl ₂ (450 mM, final 5mM) (Invitrogen)	0,2
PEG 8000 #B1004A (50%, final 17.2%) (NEB)	6,2
miLinker (15µM)	0,2
Ribonuklease-Inhibitor (RNaseOUT) (40U/µl) (Invitrogen)	0,2
T4 RNA Ligase 2 (200U/µl) (NEB)	0,2

Tabelle 3: Zusammensetzung *Tailing Mix* 1 der cDNA-Synthese

Es wurden zuerst der 10X Reaktionspuffer, das MgCl₂, das zuvor bei 37°C im Inkubator erwärmte PEG 8000 und der miLinker vermischt. Das PEG 8000 musste erwärmt werden, um dessen Viskosität herabzusetzen und das Pipettieren zu erleichtern. Als letztes wurden die beiden bereits bei Raumtemperatur arbeitenden Enzyme RNase-Inhibitor und T4 RNA Ligase 2 hinzugegeben und mit Hilfe eines Vortexmischers gründlich durchmischt, bevor der fertige T1 zur RNA hinzugegeben werden konnte. T1 = *Tailing Mix* 1, NEB = New England Biolabs GmbH, cDNA = *Complementary desoxyribonucleic acid* (komplementäre

Desoxyribonukleinsäure), MgCl₂ = Magnesiumchlorid, mM = Millimolar, μM = Mikromolar, U = Units, μl = Mikroliter, °C = Grad Celsius, RNA = Ribonukleinsäure, RNase = Ribonuklease.

Für die Synthese der cDNA wurden in die Proben, die weiterhin bei 10°C gekühlt wurden, 4μl des *Tailing Mixes 2* (T2, s. Tabelle 4) luftblasenfrei pipettiert. Dieser besteht pro umgeschriebene Probe aus 0,5 μl TaqMan® dNTPs (10 mM) von Applied Biosystems, 0,25 μl mQ RT Primer (10 μM) von Eurofins und 3,75 μl RNase-freiem Wasser. Dann wurden die Proben für 3 Minuten bei 85°C inkubiert und schließlich wieder auf 46°C gekühlt, woraufhin 5 μl des *Tailing Mixes 3* (T3, s. Tabelle 5) luftblasenfrei hinzu pipettiert wurden. Dieser besteht pro umgeschriebene Probe aus 5,25 μl 5X RT *PrimeScriptBuffer* von Clontech Takara und 0,25 μl *PrimeScript* RTase (200U/μl). Die Proben wurden ein letztes Mal bei 85°C für 3 Minuten denaturiert und dann auf 10°C gekühlt, bis das Programm beendet und die erhaltene cDNA bei -20°C aufbewahrt wurde.

<i>Tailing Mix 2</i> (T2)	Volumen (μl)
TaqMan® dNTPs (10mM) (Applied Biosystems)	0,5
mQ RT Primer (10μM) (Eurofins)	0,25
Nukleasefreies Wasser (GoTaq®, Promega)	3,75

Tabelle 4: Zusammensetzung des *Tailing Mix 2* der cDNA-Synthese

Zur Herstellung wurde das nukleasefreie Wasser mit dNTPs und dem mQ RT Primer vermischt, bevor der erhaltene T2 den Proben hinzugefügt wurde. T2 = *Tailing Mix 2*, dNTP = Desoxyribonukleosid-Triphosphate, mM = Millimolar, μM = Mikromolar, μl = Mikroliter

<i>Tailing Mix 3</i> (T3)	Volumen (μl)
5X RT <i>PrimeScriptBuffer</i> (Clontech Takara)	5,25
<i>PrimeScript</i> RTase (200U/μl) (Clontech Takara)	0,25

Tabelle 5: Zusammensetzung des *Tailing Mix 3* der cDNA-Synthese

Der T3 wird hergestellt, indem dem 5X RT Puffer die reverse Transkriptase (RTase) hinzugefügt wurde, bevor der Mix den Proben hinzugefügt wurde. T3 = *Tailing Mix 3*, μl = Mikroliter, RTase = Reverse Transkriptase, U = Units/Einheiten.

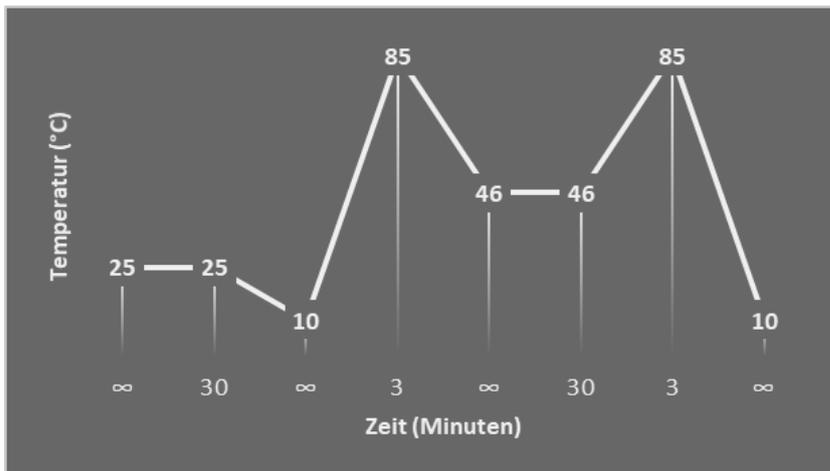


Abb. 4: Temperaturkurve des Thermocyclers

Eingestellte Temperaturkurve des Thermocyclers während der cDNA-Synthese im Zeitverlauf in Minuten. °C = Grad Celsius, ∞ = unendlich, nächster Schritt erst nach manueller Eingabe, cDNA = *Complementary desoxyribonucleic acid* (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

2.3.3 Primer-Design

Um die ausgewählten miRNAs in der PCR nachzuweisen, mussten spezifische Primer hergestellt werden, die an die miRNAs binden und sie dadurch amplifizieren. Es wurde das folgende Protokoll zum Primer-Design benutzt [78]:

1. Zunächst wurden die jeweiligen Sequenzen der einzelnen miRNAs auf www.miRbase.org herausgesucht und in DNA umgewandelt, indem alle Uracil-Basen durch Thymin ersetzt wurden (U → T)
2. Eine Guanin-Base (G) wurde dann am 3'-Ende ergänzt
3. Mit Hilfe einer kommerziellen Software (www.thermofisher.com) wurde als nächstes der voraussichtliche T_m -Wert (*melting temperature*) ermittelt (also der Schmelzpunkt, bei dem 50% einer doppelsträngigen DNA als denaturierter Einzelstrang vorliegen [79]).
4. Wenn der T_m -Wert zwischen 53 – 57 °C lag, wurde nichts verändert, lag er über 57°C, wurden Nukleotide vom 5'-Ende der miRNA-Sequenz entfernt, bis der T_m -Wert im gewünschten Bereich war, lag er unter 52°C, wurden weitere Nukleotide komplementär zur Sequenz des miLinker an das 3'-Ende der miRNA-Sequenz gehängt.
5. Als letztes musste auf www.miRbase.org noch eine Kontrolle stattfinden, ob keine Hybridisierungen des entworfenen Primers mit anderen miRNAs des gleichen Organismus möglich sind.

2.3.4 miQPCR

Für jede miRNA musste ein spezifischer *Mastermix* (MM, s. Tabelle 6) erstellt werden, wovon 11µl in jede Vertiefung der PCR-Platte (engl. *well*) gegeben wurden, zusammen mit 4µl cDNA jedes Patienten (Gesamtvolumen 15µl pro *well*). Der *Mastermix* bestand pro untersuchte Probe aus 3,64µl RNase-freiem Wasser, 0,02µl Primer (100µM) für die zu untersuchende miRNA von Eurofins, 0,02µl pm2A (100µM) von Eurofins, 8,3µl SYBR® Green I von Promega und 0,17µl CXR von Promega. Der Thermocycler wurde so programmiert, dass er zuerst auf 95°C erwärmt, 50 Wiederholungen von 15 Sekunden bei 95°C und 35 Sekunden bei 60°C machte und schließlich eine Dissoziationskurve in Form von 15 Sek. bei 95 °C, 1 Min. bei 60 °C, 15 Sek. bei 95 °C und 15 Sek. bei 60 °C folgt.

Mastermix (MM; +10% Pipettierverlust eingerechnet)	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: Zusammensetzung des *Mastermix* für die miQPCR

Nukleasefreies Wasser wurde mit einem miRNA-Primer, Upm2A, SYBR® Green I und CXR vermischt und schließlich in jedes *well* pipettiert. Aufgrund der geringen Mengen und daher möglichen Verlusten beim Pipettieren wurde eine Verlustmenge von 10% angenommen und in die Mengen einberechnet. MM = *Mastermix*, µl = Mikroliter, miRNA = Micro-Ribonukleinsäure, µM = Mikromolar, CXR = Carboxy-X-Rhodamine (Referenz-Farbstoff).

Wie oben beschrieben (s. Abschnitt 2.3), ist bei den Ergebnissen der qPCR der C_t -Wert der Zeitpunkt des Beginns der exponentiellen Vervielfältigung des PCR-Produkts. Je früher dieser Zeitpunkt eintritt und folglich niedriger der C_t -Wert, desto mehr Ausgangs-Produkt ist in der untersuchten Probe vorhanden. Man geht also davon aus, dass je niedriger der C_t -Wert, desto mehr Ausgangs-DNA ist in der untersuchten Probe vorhanden.

Als Referenz wurde im Isolierungs-Schritt eine gleichbleibende Menge cel-miR-39 hinzugegeben (s. Abschnitt 2.3.1), um Messungs-bedingte Abweichungen herauszurechnen. Die C_t -Werte der cel-miR-39 wurden von den C_t -Werten der untersuchten miRNAs auf der gleichen PCR-Platte subtrahiert ($\Delta C_t (\text{miR-xx})_{(\text{Pat. x tx})} = C_t(\text{miR-xx})_{(\text{Pat. x tx})} - C_t(\text{cel-miR-39})_{(\text{Pat. x tx})}$) und die C_t -Werte der untersuchten Proben dadurch genormt. Die errechneten ΔC_t -Werte wurden mit dem Programm GenEx von MultiD analysiert und mittels Varianzanalyse auf Signifikanz untersucht.

Zum Ausschluss von systematischen Fehlern bzw. Messungenauigkeiten zwischen den einzelnen PCR-Platten/-Versuchsansätzen wurden auf jeder Platte je zwei Testansätze einer identischen Probe mit miR-16 und cel-miR-39 sowie einer Nullprobe mit H₂O durchgeführt.

2.4 TIMP-2 und IGFBP7 im Urin

Um zu beantworten, ob die miRNA-Expressionslevel ein zuverlässiger Marker für Stress der Niere sind, wurden die Ergebnisse der miQPCR neben den KDIGO-Kriterien mit einem bereits etablierten Urin-Schnelltest für ein erhöhtes AKI-Risiko verglichen.

Der Test bestimmt mittels eines Fluoreszenzsignals in einem *Immunoassay* die Konzentration (in ng/ml) zweier Proteine im Urin: *Tissue inhibitor of metalloproteinase 2* (TIMP-2) und *Insulin-like growth factor-binding protein 7* (IGFBP7)[80] (hier wurde der Nephrocheck® *Bedside-Test* von Astute Medical genutzt). Das Messgerät errechnet aus diesen beiden Zahlenwerten das Produkt und teilt dieses durch 1000, wodurch man einen Risiko-Score für die Entwicklung einer AKI erhält. Dieser liegt zwischen 0,04 und 10,0, der *cut-off* wurde bei einem Score >0,3 gewählt (vgl. Abschnitt 1.1.4), sodass ab diesem Wert ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AKI besteht.

In der MiRAKI-Studie wurde die Bestimmung von TIMP-2 * IGFBP7 mit allen Urinproben des Zeitpunktes t₀ wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

Zum Ausschluss statistischer Ausreißer wurde Grubb's Test zur Identifizierung von Ausreißern durchgeführt.

2.5 Reagenzien, Geräte und Software

Folgende Reagenzien wurden in dieser Studie eingesetzt (s. **Tabelle 7**):

Firma	Produktname	Artikelnummer
Applied Biosystems	TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (dNTPs)	4366596
Clontech Takara	PrimeScript™ Reverse Transcriptase	2680A
Carl Roth®	Ethanol ≥99,5 %, reinst	5054.1
Carl Roth®	2-Propanol Rotislov® HPLC	7343.2
Eurofins Genomics	Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen (5' → 3'): <ul style="list-style-type: none"> • Cel-miR-39: UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (22) (RNA) • mQ RT: CCCAGTTATGGCCGTTTATGCAGGT (25) • Upm2A: CCCAGTTATGGCCGTTTA (18) • miR-1: TGAATGTAAAGAAGTATGTATG (23) • miR-21-5p: GCTTATCAGACTGATGTTTCAG (21) • miR-29c-3p: CACCATTTGAAATCGGTTAG (20) • cel-miR-39-3p: CCGGGTGTAATCAGCTTGG (20) (Primer) • miLinker: CCGTTTATGCAGGTCGTAGTTCGGCCT (27) [76] (Leihgabe mit freundlicher Unterstützung durch Dr. rer. nat. Mirco Castoldi) 	
Invitrogen by ThermoFisher Scientific	RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor (Rekombinant)	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
Quiagen	miRNeasy® Serum/Plasma Advanced Kit (50)	217204

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien

In der MiRAKI-Studie verwendete Labor-Reagenzien, alphabetisch sortiert. dNTP = Desoxyribonukleosid-Triphosphate, cel-miR-39 = Caenorhabditis elegans Micro-Ribonukleinsäure 39, M = Molar, MgCl₂ = Magnesiumchlorid, RNA = Ribonukleinsäure, qPCR = quantitative Polymerase Kettenreaktion

Folgende Geräte wurden zur Durchführung der verschiedenen Methoden eingesetzt:

Firma	Gerätname/ Gegenstand
Applied Biosystems Singapore	7300 Real-Time PCR System
Bio-Rad Singapore	C1000™ Thermal Cycler
VWR International	Galaxy Mini Centrifuge
Eppendorf	Pipetten für verschiedene Volumina (2,5 µl bis 1000 µl)
Eppendorf	Centrifuge 5417R
Scientific Industries	Vortex Genie 1 - Touch Mixer
Biozym, Eppendorf und Sarstedt AG & Co	Mikroreaktionsgefäße für verschiedene Volumina (0,2 bis 2 ml)
Binder	Inkubator
Astute Medical, San Diego	Nephrocheck® Test Kit
Hettich	Zentrifuge Rotina 420R

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Materialien

Auflistung der für die durchgeführten Experimente verwendeten Gerätschaften. PCR = Polymerase Kettenreaktion, µl = Mikroliter, ml = Milliliter.

Folgende Software wurde verwendet:

Firma	Programm
Applied Biosystems Singapore	7300 System-Software
Microsoft	Word und Excel
Clarivate Analytics	EndnoteX8
GraphPad	Prism 5
MultiD	GeneEx™

Tabelle 9: Verwendete Software

Für die Durchführung der Experimente und Analyse der Daten verwendete Software.

2.6 Statistische Auswertung

Zu statistischen Analyse der Ergebnisse aus der qPCR wurde eine Varianzanalyse verwendet und mittels der Software GeneEx™ von MultiD ausgewertet.

Die klinischen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5.03), nach Konsultation von PD Dr. Pablo Verde (Koordinierungszentrum für Klinische Studien HHU Düsseldorf), mittels *Fisher's exact test* (für kategorielle Daten), *one-way ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse)* mit *Bonferroni's multiple-comparison-test* als post-Test (für Kardinalwerte) oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post-Test (beim *Cleveland Clinic Score* aufgrund einer nicht-parametrischen Verteilung der Werte) analysiert ($\alpha = 0,05$, 95 % Konfidenzintervall (KI), 3 Nachkommastellen). P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die jeweils verwendeten statistischen Tests sind an den Tabellen ausgewiesen bzw. im Text erwähnt.

3 Ergebnisse

3.1 AKI-Gruppen

Von den 155 Patienten, die an der MiRAKI-Studie teilnahmen, wurden 148 eingeschlossenen (für Ausschlusskriterien s. Kapitel 2.1.1). Im Beobachtungszeitraum von sieben Tagen entwickelten 102 Patienten keine AKI, 33 Patienten eine AKI Grad 1 und 13 Patienten eine AKI Grad 2 oder 3 nach KDIGO.

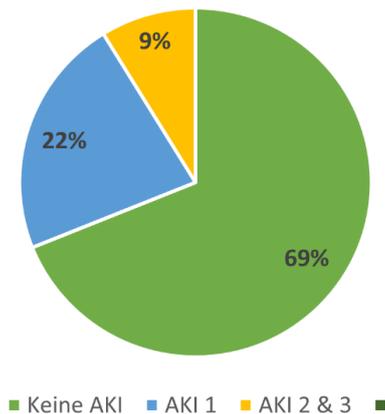


Abb. 5: Anteile der AKI-Stadien an der Studienkohorte

Aufteilung der Studienkohorte in Patienten ohne AKI („Keine AKI“), Patienten mit AKI Stadium 1 („AKI 1“) und Patienten mit AKI Stadium 2 oder 3 („AKI 2 & 3“) nach KDIGO, Angaben in Prozent. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung

3.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Die Ergebnisse des NGS lieferten einige miRNAs, die sich in ihrer Konzentration im Plasma signifikant zwischen den Patienten mit AKI und der Kontrollgruppe unterschieden. So waren beispielsweise die miR-133 bei Patienten mit AKI in geringerer Konzentration zu finden als in der Kontrollgruppe ($\log_{2}FC = -1,83$; $p = 0,0003$; $FDR = 0,33$) und die miR-375 bei den Patienten mit AKI vermehrt im Plasma nachzuweisen ($\log_{2}FC = 1,81$; $p = 0,0004$; $FDR = 0,035$). Insgesamt wurden diese beiden miRNAs aber in eher niedrigen Konzentrationen gemessen [81], wodurch eine differenzierte Analyse mittels qPCR erschwert ist.

Zur Auswahl der in dieser Studie analysierten miRNAs aus dem NGS wurden der p-Wert, die FDR und zusätzliche Literatur herangezogen. Ausgewählt wurden die miR-1, aufgrund der bereits vorhandenen Literatur mit ihrem bekannten Bezug zu kardialen Erkrankungen und signifikanten Ergebnissen im NGS ($\log_{2}FC = -2,16$; $p = 0,0001$; $FDR = 0,015$), die miR-21, welche bereits in einigen Forschungsarbeiten in Zusammenhang mit der Physiologie und Pathologien der Niere gebracht wurde [82] und sich durch ihre insgesamt relativ hohe Menge gut in der qPCR nachweisen zu lassen scheint und so auch als interne Kontrolle dient, und die miR-29c,

welche einen guten p-Wert ($p=0,025$) und eine ausreichend hohe Konzentration im NGS aufweist (s. Tabelle 10).

Name	logFC	P-Wert (↑)	FDR (↑)	AKI (TMM)	Keine AKI (TMM)
hsa-miR-1	-2,16	0,0001	0,015	973,21	4347,91
hsa-miR-29c-3p	-0,633	0,025	0,633	2039,34	3162,53
hsa-miR-21-5p	0,415	0,129	0,756	41063,76	30805,35

Tabelle 10: Auswahl der miRNAs aus dem NGS

Auswahl der miRNAs für die qPCR nach aufsteigendem p-Wert bzw. FDR sortiert. In der Spalte „logFC“ ist die Differentialexpression/Ratio von AKI zu keine AKI angegeben und in den Spalten „AKI“ bzw. „Keine AKI“ sind die TMM-Werte angegeben. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen. FDR = *False Discovery Rate* (Falscherkennungsrate), logFC = *logarithmic fold change*, AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, TMM = *trimmed mean of M-values* (Normalisierungsmethode)

3.3 Quantifizierung der miRNAs mittels qPCR

In der qPCR wurden die microRNAs miR-1, miR-21-5p und miR-29c-3p untersucht (s. Kapitel 3.2).

Zum Zeitpunkt t_0 zeigt sich bei der Analyse der C_t -Werte der miR-1 kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer veränderten Menge in den Blutproben und der Entwicklung einer AKI.

Bei der der Analyse der miR-21 zeigt sich eine Abnahme der C_t -Werte über die untersuchten Gruppen zum Zeitpunkt t_0 . Je höher das AKI-Stadium, desto niedriger der C_t -Wert, also desto mehr miR-21 liegt in der Probe vor. Obwohl dieser Zusammenhang am Zeitpunkt t_0 nicht signifikant ist ($p=0,06$, s. Tabelle 11), zeigt er sich ähnlich deutlich zum Zeitpunkt t_{24} in der grafischen Darstellung (s. Abb. 6 und Abb. 7).

Die miR-29c zeigt zum Zeitpunkt t_0 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den AKI-Gruppen (s. Tabelle 11).

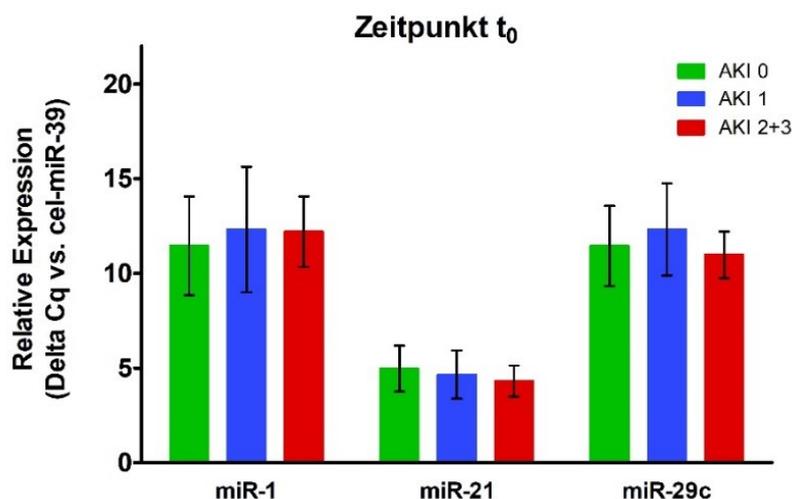


Abb. 6: Relative Expression der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c zum Zeitpunkt t_0

Dargestellt als Säulendiagramme sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der ΔC_t -Werte der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c innerhalb der jeweiligen Patientengruppen am postoperativen Zeitpunkt t_0 . Dabei entspricht ein niedrigerer Wert einer größeren Ausgangsmenge in der Probe. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, miR/miRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t_0 = Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, Cq = *cycle quantification* (= C_t -Wert), cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39, ΔC_t = Differenz des *cycle threshold* Wertes der betrachteten miRNA in Relation zur Kontrollprobe mit cel-miR-39 im jeweiligen Testansatz.

MicroRNA (t_0)	ΔC_t AKI 0 (\pm SD)	ΔC_t AKI 1 (\pm SD)	ΔC_t AKI 2 & 3 (\pm SD)	p-Wert AKI 0 vs. 1	p-Wert AKI 0 vs. 2 & 3
miR-1	11,45 (\pm 2,61)	12,32(\pm 3,31)	12,2(\pm 1,86)	0,12	0,32
miR-21	4,97 (\pm 1,21)	4,65 (\pm 1,27)	4,31 (\pm 0,81)	0,19	0,06
miR-29c	11,45 (\pm 2,12)	12,32 (\pm 2,43)	10,98 (\pm 1,23)	0,66	0,35

Tabelle 11: ΔC_t -Werte und p-Werte der qPCR-Analyse der MicroRNAs für t_0

Angegeben sind die auf zwei Dezimalstellen gerundeten Mittelwerte der C_t -Werte der untersuchten miRNAs nach Abzug des C_t -Wertes der Referenz-miRNA cel-miR-39 mit Standardabweichung zum Zeitpunkt t_0 , sortiert nach AKI-Stadien, sowie die auf zwei Dezimalstellen gerundeten p-Werte des t-Tests der Vergleiche von Gruppe AKI 0 mit den Gruppen AKI 1 bzw. AKI 2 & 3 für die untersuchten miRNAs, p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, C_t = *threshold cycle*, miR/miRNA/MicroRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t_0 = bei Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39.

In der Analyse der gemessenen C_t -Werte zeigte sich für die miR-1 zum Zeitpunkt t_{24} ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den AKI-Gruppen ($p=0,9$ bzw. $p=0,83$, s. Tabelle 12).

Die miR-21-5p weist zum Zeitpunkt t_{24} einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,003$, 95%KI [1,11; 3,72]) zwischen einer höheren Menge in der Probe und der Entwicklung einer AKI Grad 2 oder 3 innerhalb der ersten sieben postoperativen Tage auf (s. Tabelle 12).

Die miR-29c zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den AKI-Gruppen ($p=0,54$ bzw. $p=0,66$, s. Tabelle 12).

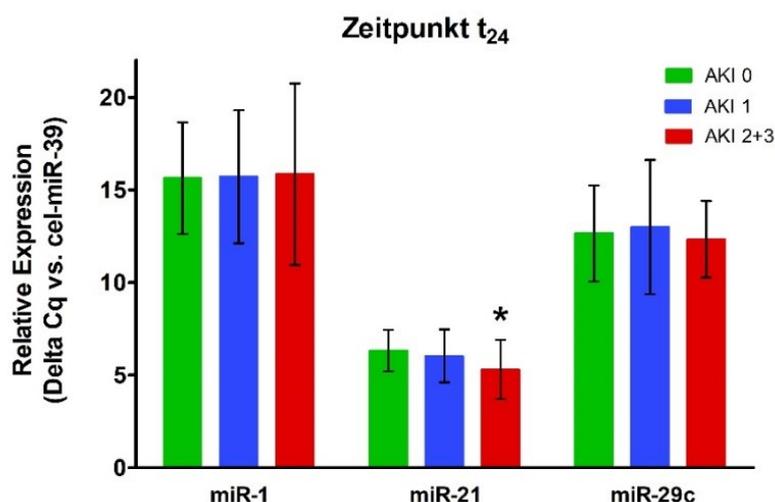


Abb. 7: Relative Expression der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c zum Zeitpunkt t₂₄

Dargestellt als Säulendiagramme sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der ΔC_t -Werte der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c innerhalb der jeweiligen Patientengruppen am postoperativen Zeitpunkt t₂₄. Dabei entspricht ein niedrigerer Wert einer größeren Ausgangsmenge in der Probe. * = p<0,05, AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, miR/miRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t₂₄ = 24 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, C_q = *cycle quantification* (= C_t-Wert), cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39, ΔC_t = Differenz des *cycle threshold* Wertes der betrachteten miRNA in Relation zur Kontrollprobe mit cel-miR-39 im jeweiligen Testansatz.

MicroRNA (t ₂₄)	ΔC_t AKI 0 (±SD)	ΔC_t AKI 1 (±SD)	ΔC_t AKI 2 & 3 (±SD)	p-Wert AKI 0 vs. 1	p-Wert AKI 0 vs. 2 & 3
miR-1	15,64 (±3,01)	15,72 (±3,59)	15,85 (±4,90)	0,9	0,83
miR-21	6,32 (±1,11)	6,03 (±1,43)	5,30 (±1,60)	0,23	0,003
miR-29c	12,65 (±2,59)	13,00 (±3,62)	12,33 (±2,07)	0,54	0,66

Tabelle 12: ΔC_t -Werte und p-Werte der qPCR-Analyse der MicroRNAs für t₂₄

Angegeben sind die auf zwei Dezimalstellen gerundeten Mittelwerte der C_t-Werte der untersuchten miRNAs nach Abzug des C_t-Wertes der Referenz-miRNA cel-miR-39 mit Standardabweichung zum Zeitpunkt t₂₄, sortiert nach AKI-Stadien, sowie die auf zwei Dezimalstellen gerundeten p-Werte des t-Tests der Vergleiche von Gruppe AKI 0 mit den Gruppen AKI 1 bzw. AKI 2 & 3 für die untersuchten miRNAs, p-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, C_t = *threshold cycle*, miR/miRNA/MicroRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t₂₄ = 24 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39.

Auch zum Zeitpunkt t₇₂ zeigt sich bei den drei untersuchten miRNAs bezüglich der Veränderungen über die AKI-Stadien keine signifikante Auffälligkeit (s. Tabelle 13).

Allerdings lässt sich im Vergleich der Mittelwerte der ΔC_t -Werte über je 1eine Gruppe zu den drei analysierten Zeitpunkten bei allen untersuchten miRNAs eine Zunahme der C_t-Werte feststellen, d. h. dass in allen drei Gruppen die Menge der drei untersuchten miRNAs im

Durchschnitt über die Zeit der ersten drei postoperativen Tage abnimmt (= steigende C_t -Werte) (s. Abb. 6, Abb. 7, Abb. 8).

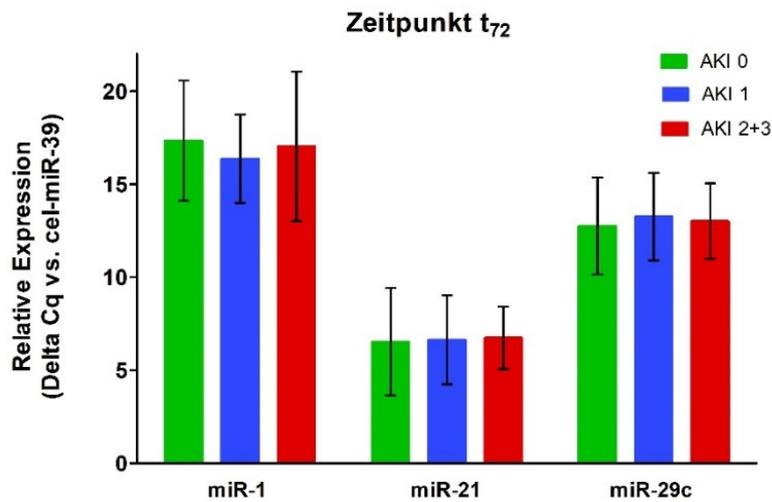


Abb. 8: Relative Expression der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c zum Zeitpunkt t_{72}

Dargestellt als Säulendiagramme sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der ΔC_t -Werte der miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c innerhalb der jeweiligen Patientengruppen am postoperativen Zeitpunkt t_{72} . Dabei entspricht ein niedrigerer Wert einer größeren Ausgangsmenge in der Probe. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, miR/miRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t_{72} = 72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, Cq = *cycle quantification* (= C_t -Wert), cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39, ΔC_t = Differenz des *cycle threshold* Wertes der betrachteten miRNA in Relation zur Kontrollprobe mit cel-miR-39 im jeweiligen Testansatz.

MicroRNA (t_{72})	ΔC_t AKI 0 (\pm SD)	ΔC_t AKI 1 (\pm SD)	ΔC_t AKI 2 & 3 (\pm SD)	p-Wert AKI 0 vs. 1	p-Wert AKI 0 vs. 2 & 3
miR-1	17,34 (\pm 3,23)	16,37 (\pm 2,38)	17,03 (\pm 4,01)	0,18	0,77
miR-21	6,54 (\pm 2,89)	6,64 (\pm 2,39)	6,74 (\pm 1,67)	0,86	0,81
miR-29c	12,76 (\pm 2,6)	13,26 (\pm 2,35)	13,01 (\pm 2,03)	0,39	0,76

Tabelle 13: ΔC_t -Werte und p-Werte der qPCR-Analyse für der MicroRNAs t_{72}

Angegeben sind die auf zwei Dezimalstellen gerundeten Mittelwerte der C_t -Werte der untersuchten miRNAs nach Abzug des C_t -Wertes der Referenz miRNA cel-miR-39 mit Standardabweichung zum Zeitpunkt t_{72} , sortiert nach AKI-Stadien, sowie die auf zwei Dezimalstellen gerundeten p-Werte des t-Tests der Vergleiche von Gruppe AKI 0 mit den Gruppen AKI 1 bzw. AKI 2 & 3 für die untersuchten miRNAs, p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, C_t = *threshold cycle*, miR/miRNA/MicroRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t_{72} = 72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, cel-miR-39 = *Caenorhabditis elegans* Micro-Ribonukleinsäure 39.

Um die relative Expression der miRNAs zwischen den Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten weiter zu veranschaulichen, wurde der *fold change* (Faktor, um den die Expression zu- oder abnimmt) bestimmt. Dieser gibt die relative Expression der miRNAs in den Gruppen AKI 1 und AKI 2 & 3 jeweils als Faktor im Vergleich zur Gruppe AKI 0 an. Negative Werte

bedeuten eine geringere Expression, positive eine erhöhte. Betrachtet man die relative Expression der miRNAs der Gruppen AKI 1 und AKI 2 & 3 im Vergleich zur Gruppe AKI 0, fällt in der grafischen Darstellung auf, dass die miR-1 an den Zeitpunkten t_0 und t_{24} in den Gruppen AKI 1 und AKI 2 & 3 jeweils geringer exprimiert wird als in der Gruppe AKI 0 und dieser Trend erst am Zeitpunkt t_{72} gebrochen wird (s. Abb. 9). Hier wird die miR-1 allerdings nur für die Gruppe AKI 1 vermehrt exprimiert, für die Gruppe AKI 2 & 3 bleibt die relative Expression unter der der Gruppe AKI 0. Die signifikant erhöhte Expression der miR-21 zum Zeitpunkt t_{24} ($p=0,003$) in der Gruppe AKI 2 & 3 zeigt sich auch im *fold change*.

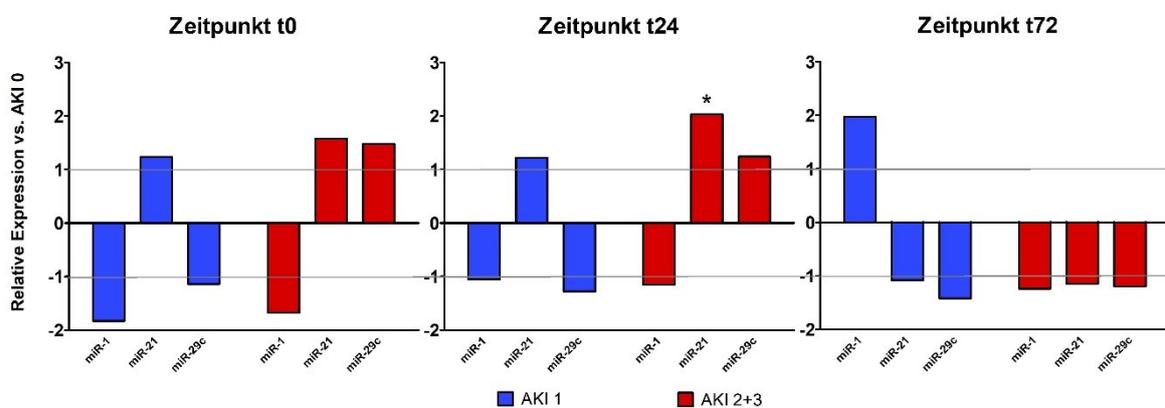


Abb. 9: Fold change der ΔC_t -Werte der miRNAs in Relation zur Gruppe AKI 0

Abgebildet als Säulendiagramme sind die jeweiligen Faktoren, um die die Expression der jeweiligen miRNAs im Vergleich zur Gruppe AKI 0 an den drei untersuchten Zeitpunkten erhöht bzw. erniedrigt sind (*fold change*). Negative Werte geben eine verminderte Expression an, positive eine erhöhte Expression, gruppiert nach AKI-Stadien. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, miR/miRNA = Micro-Ribonukleinsäure, t_0 = Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, t_{24}/t_{72} = 24/72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, ΔC_t = Differenz des *cycle threshold* Wertes der betrachteten miRNA in Relation zur Kontrollprobe mit *Caenorhabditis elegans* MicroRNA-39 im jeweiligen Testansatz.

Die Nullproben mit H_2O (s. 2.3.4) zeigten in keinem Versuchsansatz eine relevante Verunreinigung der Versuchsansätze. Die Messungen der auf jeder Platte mit durchgeführten identischen Proben zeigten für die C_t -Werte der miR-16 einen Mittelwert von 27,54 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,23$. Für die Messungen der cel-miR-39 in diesen Proben ergab sich über alle Platten ein Mittelwert von 23,41 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,27$. Insgesamt weisen die durchgeführten Messungen auf keine gerätebedingten Fehlmessungen hin.

3.4 Klinische Daten

3.4.1 Patientencharakteristika

In der Studienkohorte befinden sich 95 männliche (64 %) und 53 weibliche (36 %) Patienten (s. Abb. 10). Der mittels *Fisher's exact test* errechnete p-Wert für die Zuordnung zum Geschlecht beim Vergleich der Patienten mit (AKI 1, 2 und 3) und ohne AKI liegt bei 1,0 (OR 0,94, KI 0,45 – 1,94) und ist somit nicht signifikant.

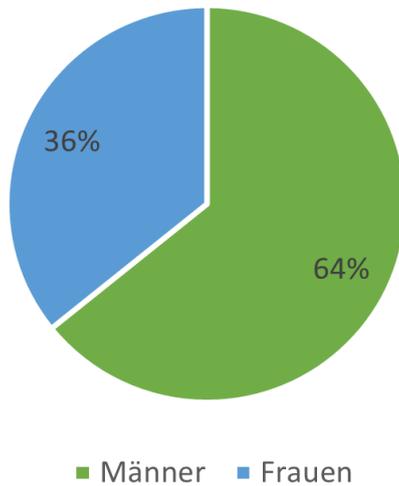


Abb. 10: Relative Geschlechterverteilung der Studienkohorte

Verteilung in Männer und Frauen in der Studienkohorte, Angaben in Prozent

Geschlecht	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Männlich	65	22	8	1,0
Weiblich	37	11	5	

Tabelle 14: Geschlechterverteilung nach AKI-Stadien (absolut)

Aufteilung der Patientenkohorte nach Geschlecht und AKI-Stadium in absoluten Zahlen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung.

Das durchschnittliche Alter beträgt 70,1 Jahre für Patienten ohne AKI, 72,6 Jahre für Patienten mit AKI Grad 1 und 69,8 Jahre für Patienten mit AKI Grad 2 oder 3 ($p=0,495$). Die Körpergröße beträgt im Mittel für Patienten ohne AKI 1,72 m, für Patienten mit AKI Grad 1 1,73 m und für Patienten mit AKI Grad 2 oder 3 1,68 m ($p=0,292$), beim Körpergewicht ist die Verteilung der Durchschnittswerte ähnlich gleichbleibend mit 81,9 kg (AKI 0), 88,1 kg (AKI 1) bzw. 80,8 kg (AKI 2 & 3) ($p=0,176$). Dementsprechend fällt auch der BMI sehr konstant aus mit 27,51 kg/m^2 (AKI 0), 28,7 kg/m^2 (AKI 1) bzw. 28,5 kg/m^2 (AKI 2 & 3) ($p=0,538$).

Zwischen den Patientengruppen gibt es nach statistischer Auswertung weder bezüglich Alter, Größe, Gewicht noch Geschlecht signifikante Unterschiede bezüglich der Entwicklung einer AKI (s. Tabelle 15).

Charakteristika	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Alter (Jahre)	70,1 (±10,6)	72,6 (±9,9)	69,8 (±13,0)	0,495
Größe (m)	1,72 (±0,09)	1,73 (±0,1)	1,68 (±0,07)	0,292
Gewicht (kg)	81,9 (±17,7)	88,1 (±15,6)	80,8 (±18,7)	0,176
BMI (kg/m ²)	27,5 (±5,33)	28,7 (±6,98)	28,5 (±6,44)	0,538

Tabelle 15: Mittelwerte, p-Werte und Konfidenzintervalle der Patientencharakteristika nach AKI-Stadien
Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben. Die p-Werte wurden nach dem *one-way ANOVA/ Bonferroni's Multiple Comparison Test* errechnet, ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, m = Meter, kg = Kilogramm.

3.4.2 Komorbiditäten

Erfasst und analysiert wurden bekannte Vorerkrankungen der eingeschlossenen Patienten, die bekannte oder vermutete Risikofaktoren für Herz- und Gefäßerkrankungen und die Entwicklung einer Nierenschädigung sind (s. Tabelle 16).

Bezüglich der Komorbiditäten zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge mit der Entwicklung einer AKI, allerdings zeigt sich bei einzelnen Komorbiditäten eine tendenzielle Korrelation zur Entstehung einer AKI und deren Schweregrad. So zeigen beispielsweise Patienten mit einer höhergradigen AKI tendenziell eine erhöhte Prävalenz für Diabetes mellitus (AKI 0: 26,47%, AKI 1: 38,24%, AKI 2 & 3: 50%, $p=0,085$), allerdings ergibt sich auch hier keine Signifikanz zwischen den Gruppen mit AKI und der nicht an AKI erkrankten Gruppe. Ähnliche Muster zeigen sich bei der Analyse von vorbestehendem Übergewicht, definiert durch einen BMI $>30\text{kg/m}^2$ (AKI 0: 29,41%, AKI 1: 41,18%, AKI 2 & 3: 50%, $p=0,132$). Die sonstigen erfassten Vorerkrankungen zeigen keine signifikante Verteilung zwischen den Gruppen, allerdings bilden hier die Patienten mit einer bereits in der Vorgeschichte stattgehabten kardiochirurgischen Operation eine Ausnahme. In der Analyse mittels *Fisher's exact test* (keine AKI vs. AKI 1, 2 & 3) zeigt sich keine Signifikanz bei der Verteilung (AKI 0: 8,82%, AKI 1: 8,82%, AKI 2 & 3: 41,67%, $p=0,164$), in der Analyse mittels Chi²-Test (AKI 0 vs. AKI 1 vs. AKI 2 & 3) stellt sich die Verteilung im Gegensatz zu den anderen untersuchten Komorbiditäten allerdings als signifikant dar ($p=0,0029$). Dies könnte ein Hinweis auf einen etwaigen Einfluss auf die Entstehung einer AKI sein, den man z. B. mit einer größeren Patientenzahl verifizieren könnte.

Komorbiditäten	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Hypertension (%)	75,49	70,59	75	0,686
Hypercholesterinämie (%)	42,16	41,18	33,33	0,857
Diabetes mellitus (%)	26,47	38,24	50,00	0,085
Raucher (%)	13,73	17,65	8,33	0,803
Übergewicht (BMI >30 kg/m ² KOF) (%)	29,41	41,18	50	0,132
Positive Familienanamnese für KHK (%)	12,75	5,88	0	0,148
Koronare Herzkrankheit (%)	67,65	55,88	66,67	0,353
Arterielle Verschlusskrankheit (%)	19,61	32,35	25	0,205
Stattehabte kardiale OP (%)	8,82	8,82	41,67	0,164
Stattehabte kardiale Intervention (%)	24,51	17,65	33,33	0,835
Vorhofflimmern (%)	37,25	38,24	41,67	0,856
Herzinsuffizienz (%)	36,27	35,29	50	0,854

Tabelle 16: Verteilung der Komorbiditäten nach AKI-Stadien

Angegeben sind die prozentualen Anteile der Patienten in der jeweiligen AKI-Gruppe, die die jeweilige Vorerkrankung aufwiesen, angegeben in Prozent. P-Werte nach *Fisher's exact test* (AKI 0 vs. AKI 1,2 & 3), p-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, BMI = *body mass index*, kg/m² = Kilogramm pro Quadratmeter, KOF = Körperoberfläche, KHK = Koronare Herzerkrankung, OP = Operation.

3.4.3 STS-Score und Cleveland Clinic Score

Der *STS-Score* wurde zur Berechnung der perioperativen Mortalität und Morbidität entwickelt, wobei wir uns auf das Risiko für AKI, Tod und Apoplex beschränken. Er bezieht verschiedene Patienten- und Operations-bezogene Faktoren in die Risikoberechnung ein. Bei der statistischen Analyse des *STS-Scores* mittels *one-way ANOVA* zeigt sich für die erhöhte Wahrscheinlichkeit von Tod, AKI und Apoplex in der Patientengruppe mit AKI im Vergleich zur Gruppe ohne AKI eine hohe Signifikanz (Risiko für Tod: $p < 0,0001$, Risiko für AKI: $p < 0,0001$, Risiko für Apoplex: $p = 0,003$). Diese wird bei allen drei Kategorien beim Vergleich der Gruppen AKI 0 mit AKI 2 & 3 durch die jeweiligen Konfidenzintervalle bestätigt (Risiko für Tod: KI [-5,47 bis -1,85], Risiko für AKI: KI [-9,70 bis -3,18], Risiko für Apoplex: KI [-1,87 bis -0,288]).

STS-Score	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Risiko für Tod (% ± SD)	2,55 (±1,97)	3,71 (±3,0)	6,21 (±4,61)	< 0,0001
Risiko für AKI (% ± SD)	5,02 (±4,36)	6,8 (±3,46)	11,5 (±7,66)	< 0,0001
Risiko für Apoplex (% ± SD)	1,65 (±0,96)	2,06 (±1,35)	2,73 (±1,53)	0,003

Tabelle 17: Mittelwerte mit Standardabweichungen, p-Werte und Konfidenzintervalle für den *Society of thoracic surgeons (STS-) Score*

Aus dem *STS-Score* wurden die errechneten Risiken für Tod, AKI und Apoplex entnommen. Die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen und angegebenen p-Werte sind mittels *one-way ANOVA* berechnet, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, STS = *Society of thoracic surgeons*.

Der *Cleveland Clinic Score* berechnet das Risiko für ein postoperatives dialysepflichtiges Nierenversagen nach kardiochirurgischen Operationen anhand verschiedener Laborparameter. Der *Cleveland Clinic Score* wurde mittels Kruskal-Wallis ANOVA analysiert, da es sich um einen *Ranking-Score* handelt, auch wenn formell die Wahrscheinlichkeit für eine postoperative Dialysepflichtigkeit innerhalb der Ränge in Prozent angegeben wird.

In der Analyse des *Cleveland Clinic Scores* zeigte sich, dass dieser die Entwicklung einer AKI signifikant voraussagen konnte ($p=0,005$ s. Tabelle 18).

<i>Cleveland Clinic Score</i>	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Mittelwert ± SD	1,41 (±1,79)	1,48 (±0,6)	1,68 (±0,4)	0,005

Tabelle 18: Mittelwerte und p-Wert für den *Cleveland Clinic Score*

Berechneter *Score* mit jeweiligem Mittelwert mit Standardabweichung für jede AKI-Gruppe und angegebenem p-Wert. Der p-Wert wurde mittels *one-way ANOVA* nach Kruskal-Wallis berechnet, die Signifikanz zwischen den Gruppen mittels eines *Dunn's post-Test* verifiziert, p-Werte $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung.

3.4.4 Volumenhaushalt

Im Hinblick auf das intra- und postoperative Volumenmanagement wurden Diurese, Kristalloidbilanz und die Gabe von kolloidalen Volumensubstituten analysiert.

Bei den Mittelwerten der Diurese zeigt sich intraoperativ keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen ($p=0,072$), jedoch zeigt sich postoperativ zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Differenz der Diurese beim Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 2 & 3 (1-24h postoperativ $p<0,0001$, 25-48h postoperativ $p=0,017$, 49-72h postoperativ $p=0,028$), auch wenn diese Signifikanz im Vergleich zwischen den Gruppen am dritten postoperativen Tag nicht im post-Test bestätigt werden kann (KI AKI 0 vs. AKI 2 & 3 [-0,231 bis 0,932]) (s. Tabelle 19).

Gleiches zeigt sich bei der Analyse der Kristalloidbilanz. Intraoperativ ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen ($p=0,304$), allerdings zeigt sich dieser für alle postoperativen Zeitpunkte (1-24h postoperativ $p=0,002$, 25-48h postoperativ $p=0,012$, 49-72h postoperativ $p<0,0001$, s. Tabelle 19). Im Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 1 kann die Signifikanz nicht durch das 95%-Konfidenzintervall bestätigt werden, jedoch zeigt sich im Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 2 & 3 zu allen analysierten postoperativen Zeitpunkten eine signifikante Korrelation einer höheren positiven Kristalloidbilanz mit Entstehung einer AKI Grad 2 oder 3 (AKI 0 vs. AKI 2 & 3: KI (t_0) [-3534 bis -558], KI (t_{24}) [-1914 bis -180], KI (t_{72}) [-2520 bis -498]).

Bei Betrachtung der kolloidalen Volumengaben zeigen sich nur wenige signifikante Werte. Beispielsweise finden sich zur Hydroxyethylstärke (HAES) nur intraoperative Gaben ($n=51$), die zudem keine Signifikanz bezüglich der Verteilung zwischen den Gruppen aufweisen ($p=0,201$), an den postoperativen Zeitpunkten fand keine Gabe von HES statt (s. Tabelle 19). Die Gabe von Gelatine zeigt intraoperativ einen signifikanten Zusammenhang im Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 2 & 3 ($p=0,005$), ebenso zum Zeitpunkt 49-72h postoperativ für den Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 1 ($p=0,007$). Die Analysen zu den übrigen Zeitpunkten zeigen keine Signifikanz bezüglich der Gabe von Gelatine. Albumingaben erfolgten nur postoperativ und zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 19). Auch hier wurde über das gesamte Patientenkollektiv betrachtet selten Albumin verabreicht ($n=12$).

Volumenmanagement	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Diurese (ml/kg KG/h) (Mittelwert ± SD)				
Intraoperativ	3,78 (±3,02)	2,84 (±2,25)	2,14 (±1,69)	0,072
1-24h postoperativ	1,59 (±0,68)	1,33 (±0,5)	0,65 (±0,38)	< 0,0001
25-48h postoperativ	1,41 (±0,62)	1,43 (±0,72)	0,87 (±0,68)	0,017
49-72h postoperativ	1,43 (±0,57)	1,75 (±0,77)	1,08 (±1,74)	0,028
Kristalloidbilanz (ml) (Mittelwert ± SD)				
Intraoperativ	1352 (±1317)	1787 (±1835)	1325 (±1074)	0,304
1-24h postoperativ	3415 (±1902)	4168 (±2516)	5460 (±2270)	0,002
25-48h postoperativ	269 (±1053)	208 (±1410)	1316 (±1795)	0,012
49-72h postoperativ	12 (±1105)	-587 (±1305)	1521 (±2484)	< 0,0001
Hydroxyethylstärke (ml) (Mittelwert ± SD)				
Intraoperativ	289 (±436)	152 (±293)	192 (±325)	0,201
1-72h postoperativ	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k. A.
Gelatine (ml) (Mittelwert ± SD)				
Intraoperativ	0 (±0)	0 (±0)	77 (±277)	0,005
1-24h postoperativ	193 (±346)	303 (±352)	154 (±315)	0,231
25-48h postoperativ	20 (±120)	76 (±182)	0 (±0)	0,075
49-72h postoperativ	5 (±50)	61 (±166)	0 (±0)	0,007
Albumin (g) (Mittelwert ± SD)				
Intraoperativ	0 (±0)	0 (±0)	0 (±0)	k. A.
1-24h postoperativ	1,78 (±8,53)	3,03 (±10,2)	9,23 (±22,5)	0,066
25-48h postoperativ	0,78 (±7,92)	0,61 (±3,48)	0 (±0)	0,924
49-72h postoperativ	0 (±0)	0,61 (±3,48)	0 (±0)	0,178

Tabelle 19: Volumenmanagement intra- und postoperativ

Angegeben sind die Mittelwerte und p-Werte für kristalloide und kolloidale Volumengaben zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten für jede AKI-Gruppe. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben, die p-Werte wurden mittels *one-way ANOVA* und *Bartlett's post-Test* ermittelt, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, ml/kg KG/h = Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde, ml = Milliliter, g = Gramm, k.A. = Keine Angabe.

3.4.5 Laborparameter der Nierenfunktion

Untersucht wurden die aktuell im klinischen Alltag relevanten und regelhaft auf der Intensivstation angewendeten Laborparameter zur Nierenfunktion im Blutplasma. Zusätzlich

wurden zum Zeitpunkt t_0 ausgewählte Laborparameter (s. Tabelle 22) und das Produkt aus TIMP-2 und IGFBP7 im Urin bestimmt.

Bei der Analyse der Serumkreatinin-Werte zeigt sich an allen postoperativen Zeitpunkten ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumkreatinin und der Entwicklung einer AKI (s. Tabelle 20). Darüber hinaus zeigte sich jedoch auch präoperativ ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des Serumkreatinins und der Entwicklung einer AKI ($p=0,002$), welcher durch die Konfidenzintervalle im Gruppenvergleich bestätigt wird (KI AKI 0 vs. 1 [-0,41 bis 0,04], KI AKI 0 vs. 2 & 3 [-0,56 bis 0,02]). Eine ähnliche Konstellation lässt sich auch bei der mit der CKD-EPI-Formel errechneten GFR feststellen: Die GFR ist zu allen untersuchten postoperativen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (jeweils $p<0,0001$, s. Tabelle 20). Die einzige Ausnahme bildet jedoch die präoperative Messung, die hier in der Varianzanalyse zwar signifikant ist ($p=0,001$), im post-Test aber nur für den Vergleich der Gruppen AKI 0 und AKI 1 bestätigt werden kann (KI AKI 0 vs. 1 [4,26 bis 21,7], KI AKI 0 vs. 2 & 3 [-3,04 bis 23,5]). Als Einschränkung zu diesen Ergebnissen ist allerdings zu erwähnen, dass die Berechnung der GFR mit der CKD-EPI-Formel nicht für Patienten auf der Intensivstation validiert wurde und in diesem Setting eine größere Ungenauigkeit aufweist [83-85].

Die Auswertung des Cystatin C im Serum ergibt ähnliche Ergebnisse. Zu den Zeitpunkten t_0 , t_{24} , t_{72} und beim Höchstwert von Tag vier bis sieben zeigt sich eine signifikante Verteilung der Laborwerte zwischen der Patientengruppe ohne AKI, der mit AKI 1 und der mit AKI 2 & 3 (t_0 $p<0,0001$, t_{24} $p=0,0001$, t_{72} $p=0,006$, d4-7 (max) $p=0,0001$). Dies bestätigt sich ebenfalls im Gruppenvergleich, die einzige Ausnahme bildet hier der Vergleich AKI 0 und AKI 1 zum Zeitpunkt t_{72} (KI (t_0) AKI 0 vs. AKI 1 [-0,316 bis -0,0350], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-0,655 bis -0,183]; KI (t_{24}) AKI 0 vs. AKI 1 [-0,538 bis -0,186], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-1,14 bis -0,652]; KI (t_{72}) AKI 0 vs. AKI 1 [-1,86 bis 0,388], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-3,03 bis -0,602]; KI (d4-7) AKI 0 vs. AKI 1 [-1,57 bis -0,259], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-2,38 bis -0,818]). Zu den Zeitpunkten präoperativ und t_{48} gibt es nicht genügend Daten, um eine sinnvolle statistische Analyse hinsichtlich des Cystatin C durchzuführen, weshalb diese hier entfallen. Diese Ergebnisse finden sich gleichfalls in der mittels Cystatin-C errechneten GFR wieder (s. Tabelle 21).

Nierenwerte	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Kreatinin (mg/dl) (Mittelwert ± SD)				
Präoperativ	1,16 (±0,33)	1,38 (±0,34)	1,45 (±0,71)	0,002
t ₀	1,03 (±0,27)	1,23 (±0,34)	1,29 (±0,34)	0,0003
t ₂₄	1,08 (±0,3)	1,51 (±0,4)	1,88 (±0,45)	< 0,0001
t ₄₈	1,0 (±0,32)	1,63 (±0,51)	2,02 (±0,84)	< 0,0001
t ₇₂	0,96 (±0,32)	1,62 (±0,57)	2,11 (±1,31)	< 0,0001
d4-7	1,01 (±0,29)	1,66 (±0,49)	2,38 (±1,21)	< 0,0001
GFR-CKD-EPI (ml/min) (Mittelwert ± SD)				
Präoperativ	62,8 (±19)	49,8 (±14,8)	52,6 (±21,1)	0,001
t ₀	69,9 (±16,9)	56,8 (±16,5)	51,6 (±11,9)	< 0,0001
t ₂₄	67,1 (±18,9)	45,1 (±14)	34,2 (±10,4)	< 0,0001
t ₄₈	72,1 (±20,7)	41,5 (±12,7)	33,9 (±13,6)	< 0,0001
t ₇₂	76,1 (±20,7)	42,8 (±15,8)	37,9 (±20,5)	< 0,0001
d4-7	71,3 (±19,3)	41,1 (±15,3)	32,2 (±20,6)	< 0,0001

Tabelle 20: Nierenbezogene Laborparameter (Teil 1)

Mittelwerte und p-Werte für nierenbezogene Laborparameter in den jeweiligen AKI-Gruppen für die Zeitpunkte präoperativ bis t₇₂ und den jeweils schlechtesten beziehungsweise höchsten Wert zwischen Tag 4 und Tag 7 postoperativ. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, p-Werte ≤0,05 wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, t₀ = Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, t₂₄/t₄₈/t₇₂ = 24/48/72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, d4-7 = Tag vier bis sieben nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, CKD-EPI = *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, mg = Milligramm, ml = Milliliter, dl = Deziliter, L = Liter, min = Minute, k.A. = Keine Angabe.

Des Weiteren wurde der Serumharnstoff der Patienten analysiert, bei dem sich an allen untersuchten postoperativen Zeitpunkten eine signifikante Verteilung der Werte zwischen den Gruppen findet (t₀ p=0,012, t₂₄ p<0,0001, t₄₈ p<0,0001, t₇₂ p<0,0001, d4-7 (max.) p<0,0001), was sich, mit Ausnahme der Gruppe AKI 0 vs. AKI 1 zum Zeitpunkt t₀, auch in den Gruppenvergleichen bestätigt. Lediglich zum präoperativen Zeitpunkt zeigt sich kein signifikanter Unterschied des Serumharnstoffs zwischen den untersuchten Gruppen (p=0,099) (s. Tabelle 21).

Nierenwerte	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Cystatin C (mg/l) (Mittelwert ± SD)				
Präoperativ	1,46 (±0,18)	1,56 (±0,41)	1,46 (±0,64)	0,959
t ₀	1,04 (±0,27)	1,22 (±0,25)	1,46 (±0,43)	< 0,0001
t ₂₄	1,12 (±0,3)	1,49 (±0,32)	2,02 (±0,56)	< 0,0001
t ₄₈	1,96 (±0,35)	1,74 (±0,58)	0 (±0)	k. A.
t ₇₂	1,2 (±0,52)	1,94 (±0,29)	3,02 (±0,76)	0,006
d4-7	1,46 (±0,38)	2,37 (±0,39)	3,05 (±0,7)	0,0001
GFR-Cystatin (ml/min) (Mittelwert ± SD)				
Präoperativ	46,5 (±7,8)	45,7 (±15,5)	52,5 (±27,6)	0,912
t ₀	74,6 (±22,9)	59,7 (±14,3)	51,7 (±21,5)	0,0002
t ₂₄	68,6 (±22,2)	47,4 (±12,9)	34,0 (±14,8)	< 0,0001
t ₄₈	32,0 (±7,1)	40,3 (±14,9)	0 (±0)	k. A.
t ₇₂	70,5 (±36,5)	32,8 (±4,7)	19,3 (±7,8)	0,041
d4-7	49,8 (±16,7)	25,2 (±5,5)	18,6 (±5,7)	< 0,0001
Harnstoff (mg/dl) (Mittelwert ± SD)				
Präoperativ	45,4 (±18,6)	51,3 (±17,3)	56,2 (±33,4)	0,099
t ₀	35,3 (±14,4)	40,5 (±14,3)	48,5 (±23)	0,012
t ₂₄	36,9 (±16,3)	48,8 (±20,5)	64,8 (±23)	< 0,0001
t ₄₈	40,4 (±19,8)	58,0 (±24,5)	70,2 (±30,9)	< 0,0001
t ₇₂	41,0 (±19,5)	65,3 (±27,3)	72,0 (±37,1)	< 0,0001
d4-7	41,2 (±17,3)	73,2 (±30,8)	91,5 (±42,6)	< 0,0001

Tabelle 21: Nierenbezogene Laborparameter (Teil 2)

Mittelwerte und p-Werte für nierenbezogene Laborparameter in den jeweiligen AKI-Gruppen für die Zeitpunkte präoperativ bis t₇₂ und den jeweils schlechtesten beziehungsweise höchsten Wert zwischen Tag 4 und Tag 7 postoperativ. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, p-Werte ≤0,05 wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, t₀ = Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, t₂₄/t₄₈/t₇₂ = 24/48/72 Stunden nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, d4-7 = Tag vier bis sieben nach Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, CKD-EPI = *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*, mg = Milligramm, ml = Milliliter, dl = Deziliter, L = Liter, min = Minute, k. A. = Keine Angabe.

Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt t₀ mehrere Urinparameter bestimmt. Dabei fällt auf, dass in der Analyse von Proteinen, Albumin, α1-Microglobulin und IgG ein signifikanter Zusammenhang zur Entwicklung einer AKI 2 oder 3 besteht (Proteine p<0,0001, Albumin p<0,0001, α1-Microglobulin p=0,049, IgG p=0,003; s. Tabelle 22). Die Signifikanz für α1-

Microglobulin kann im post-Test für beide Gruppenvergleiche nicht bestätigt werden (KI AKI 0 vs. AKI 1 [-38,2 bis 11,3], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-75,1 bis 1,75]).

Urin (t ₀) (Mittelwert ± SD)	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Dichte (g/ml)	1,01 (±0,01)	1,01 (±0,01)	1,02 (±0)	0,275
pH	5,72 (±0,76)	5,88 (±1,03)	5,0 (±0)	0,219
Kreatinin (mg/dl)	20,4 (±16,6)	26,9 (±15,5)	28,9 (±16)	0,180
Proteine (mg/l)	112 (±113)	163 (±140)	427 (±427)	< 0,0001
Albumin (mg/l)	29,8 (±31,3)	47,8 (±44,9)	198 (±225)	< 0,0001
α1-Microglobulin (mg/l)	23,9 (±28,9)	37,4 (±42,9)	60,6 (±78,2)	0,049
IgG (total) (mg/l)	22,7 (±19,3)	19,0 (±12,4)	90,9 (±78,7)	0,003
Osmolalität (mosm/kg)	337 (±89,8)	366 (±85,1)	358 (±73,3)	0,417

Tabelle 22: Im Urin bestimmte Laborparameter zum Zeitpunkt t₀

Mittelwerte der Laborparameter im Urin zum Zeitpunkt t₀ in den verschiedenen AKI-Gruppen. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, p-Werte ≤0,05 wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, t₀ = bei Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, mg = Milligramm, g = Gramm, kg = Kilogramm, ml = Milliliter, dl = Deziliter, L = Liter, mosm/kg = Milliosmol pro Kilogramm (Einheit der Osmolalität), IgG = Immunglobulin G.

3.4.5.1 TIMP-2 und IGFBP7 im Urin

Die Analyse der Messung von TIMP-2 und IGFBP7 im Urin zeigt in dieser Studie, wie anhand der bisher zu diesem Biomarker durchgeführten Studien zu erwarten war, eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Werten und der Entwicklung einer AKI (p=0,022, s. Tabelle 23).

TIMP-2 * IGFBP7 (t ₀)	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Mittelwert (± SD)	0,5 (±1,85)	0,7 (±1,35)	2,07 (±3,14)	0,022

Tabelle 23: Analyse der Zahlenwerte des Produkts aus TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 zum Zeitpunkt t₀

Angegeben sind die Mittelwerte des Produkts aus TIMP-2 * IGFBP7 geteilt durch 1000 in den jeweiligen AKI-Gruppen. Mittelwerte mit Standardabweichungen und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, AKI 0 = keine AKI, SD = Standardabweichung, t₀ = bei Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ.

Wählt man außerdem den in der Sapphire-Studie von Kashani et al. und der Topaz-Studie von Bihorac et al. validierten *cut-off* von 0,3 [30, 31] und bestimmt entsprechend, ob sich eine signifikante Verteilung ober- bzw. unterhalb dieses Schwellenwertes ergibt, zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 >0,3 und Entwicklung einer höhergradigen AKI (p=0,001). Hierfür wurde *Fisher's exact test* verwendet (s. Tabelle 24).

Dieses Ergebnis lässt sich auch für den *cut-off* von >2 feststellen ($p=0,046$). Ab diesem Wert stieg in der Sapphire-Studie das Risiko für eine AKI Grad 2 oder 3 auf das Fünffache [30].

TIMP-2 * IGFBP7 (t_0)	AKI 0 (n=102)	AKI 1 (n=33)	AKI 2 & 3 (n=13)	p-Wert AKI 0 vs. 1	p-Wert AKI 0 vs. 2 & 3
<i>Cut-off</i> >0,3	28	12	10	0,38	0,001
<i>Cut-off</i> >2	5	3	3	0,4	0,046

Tabelle 24: Analyse der *cut-off*-Werte des Produkts aus TIMP-2 * IGFBP7 /1000 zum Zeitpunkt t_0

Angegeben sind die Anzahl der Patienten, die TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 >0,3 bzw. >2 aufwiesen und die p-Werte nach *Fisher's exact test* für jeweils die beiden *cut-off*-Werte im Vergleich der jeweiligen AKI-Gruppen. p-Werte $\leq 0,05$ werden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, AKI 0 = keine AKI, t_0 = bei Aufnahme auf der Intensivstation postoperativ, n = Anzahl der Patienten insgesamt pro Patientengruppe.

Die AUC (*area under the curve*) des Produkts aus TIMP-2 * IGFBP7 /1000 in der MiRAKI-Studie beträgt 0,82 für den Vergleich von Patienten mit höhergradiger AKI mit Patienten ohne AKI (SD $\pm 0,06$, KI [0,71-0,93], $p=0,0001$) (s. Abbildung 1).

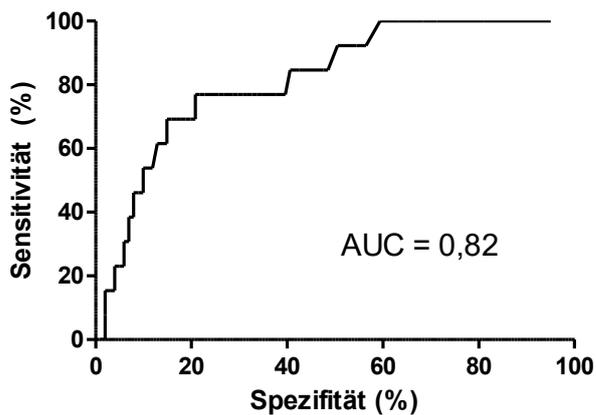


Abbildung 1: *Receiver operating characteristic (ROC-) curve* von AKI 0 vs. AKI 2 und 3

Die Abbildung zeigt die Spezifität des Produkts aus TIMP-2 * IGFBP7 / 1000 (x-Achse) im Verhältnis zu dessen Sensitivität (y-Achse). Eine AUC > 0,8 wird als Kriterium für eine gute Diskriminierung des Tests erachtet [86]. AKI = *acute kidney injury*/akute Nierenschädigung, AUC = *area under the curve* (Fläche unter der Kurve).

3.4.5.2 Nierenersatzverfahren

Von den 148 Patienten in dieser Studie erhielt keiner mit AKI 0 oder 1 ein Nierenersatzverfahren (*renal replacement therapy*, RRT). Sechs Patienten mit AKI 2 oder 3 benötigten innerhalb der ersten drei postoperativen Tage eine RRT, wobei sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer durchgeführten RRT und der Entwicklung einer hochgradigen AKI zeigte (s. Tabelle 25).

	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
RRT 0-72 h postoperativ	0	0	6	0,001

Tabelle 25: Anzahl der Patienten mit Nierenersatzverfahren postoperativ

Zahl der Patienten, die postoperativ ein Nierenersatzverfahren erhielten nach AKI-Stadien mit p-Wert. Der p-Wert wurde mittels Fisher's exact test bestimmt, ein p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, RRT = *renal replacement therapy*, h = Stunde.

3.4.6 Transfusion

Die Analyse der transfundierten Blutprodukte zeigt, dass die Patienten, die eine AKI entwickelten, signifikant häufiger intra- und postoperative Bluttransfusionen erhielten als die, die keine AKI entwickelten. Dies trifft für alle untersuchten Zeitpunkte für Erythrozytenkonzentrate (intraoperativ $p < 0,0001$; 1-24h postoperativ $p = 0,003$; 25-48 h postoperativ $p < 0,0001$; 49-72 h postoperativ $p = 0,002$) und gefrorene Frischplasmen (intraoperativ $p = 0,001$; 1-24h postoperativ $p = 0,001$; 25-48 h postoperativ $p = 0,0002$; 49-72 h postoperativ $p = 0,003$) zu (s. Tabelle 26). Im post-Test bestätigt sich dieser Zusammenhang allerdings nur für die Patientengruppe mit einer AKI Grad 2 oder 3. Ausnahmen bilden dabei der intraoperative Zeitpunkt für die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ($p < 0,0001$, KI (95%) AKI 0 vs. 1: -3,43 bis 0,9) und der Zeitpunkt 49-72h postoperativ für gefrorene Frischplasmen ($p = 0,003$, KI (95%) AKI 0 vs. 1: -0,97 bis 0,05), die auch für die Gruppe AKI 1 signifikant sind. Der Blick auf die statistische Auswertung der Gaben von Thrombozytenkonzentraten zeigt nur zu den Zeitpunkten intraoperativ und 25-48h postoperativ signifikante Zusammenhänge zur Entwicklung einer AKI (intraoperativ $p < 0,0001$; 25-48h postoperativ $p = 0,015$). Die Auswertung der postoperativ verabreichten Thrombozytenkonzentrate ist aufgrund ihrer geringen Anzahl (intraoperativ $n = 168$ vs. postoperativ $n = 43$) eher wenig aussagekräftig (s. Tabelle 26).

Blutprodukte/Zeitraum	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Erythrozytenkonzentrate (Mittelwert Anzahl ± SD)				
Intraoperativ	1,8 (±2,1)	3,97 (±2,77)	6,0 (±4,95)	< 0,0001
1-24h postoperativ	0,63 (±1,16)	1,24 (±1,56)	1,85 (±2,23)	0,003
25-48h postoperativ	0,17 (±0,55)	0,52 (±1,18)	1,31 (±1,38)	< 0,0001
49-72h postoperativ	0,17 (±0,49)	0,42 (±1,06)	0,92 (±1,26)	0,002
Gefrorene Frischplasmen (Mittelwert Anzahl ± SD)				
Intraoperativ	0,05 (±0,5)	0,49 (±1,2)	1,0 (±2,31)	0,001
1-24h postoperativ	1,22 (±1,9)	2,33 (±3,19)	3,54 (±3,48)	0,001
25-48h postoperativ	0,35 (±1,15)	0,64 (±1,19)	2,0 (±2,48)	0,0002
49-72h postoperativ	0,1 (±0,59)	0,61 (±1,37)	0,85 (±1,68)	0,003
Thrombozytenkonzentrate (Mittelwert Anzahl ± SD)				
Intraoperativ	0,76 (±1,23)	1,85 (±1,87)	2,31 (±2,14)	< 0,0001
1-24h postoperativ	0,17 (±0,55)	0,21 (±0,78)	0,54 (±0,97)	0,154
25-48h postoperativ	0 (±0)	0,09 (±0,38)	0,31 (±1,11)	0,015
49-72h postoperativ	0,01 (±0,1)	0,09 (±0,38)	0,08 (±0,28)	0,129

Tabelle 26: Mittelwerte für die transfundierten Blutprodukte

Angegeben sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für die pro Patienten transfundierten Blutprodukte (Erythrozytenkonzentrate, Gefrorene Frischplasmen und Thrombozytenkonzentrate) pro AKI-Gruppe. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, p-Werte ≤0,05 wurde als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, h = Stunde.

3.4.7 Hämodynamik

Als Surrogat-Parameter für die hämodynamische Stabilität der Patienten wurden die verabreichten kreislaufunterstützenden Medikamente wie Katecholamine und Inotropika, sowie Herzfrequenz und arterieller Mitteldruck ausgewertet.

Bei der Analyse der Dosierungen der kreislaufunterstützenden Medikamente ist bei der gegebenen Menge an Noradrenalin an allen untersuchten Zeitpunkten festzustellen, dass eine höhere Menge signifikant mit der Entwicklung einer AKI einhergeht (intraoperativ p=0,004; 1-24h postoperativ p<0,0001; 25-48h postoperativ p<0,0001; 49-72h postoperativ p<0,0001; s. Tabelle 27), was bis auf den intraoperativen Analysezeitpunkt auch über alle Gruppen im *post-Test* bestätigt werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Gabe von Adrenalin (n=31 Patienten) nur bei den drei postoperativen Zeitpunkten ein signifikanter Zusammenhang (1-24h postoperativ p<0,0001; 25-48h postoperativ p<0,0001; 49-72h postoperativ p<0,0001; s. Tabelle 27), was sich auch im *post-Test* für alle Gruppen bestätigt. Bei den Ergebnissen für

die Analyse der verabreichten Dobutamin-Mengen zeigt sich nur noch 25 bis 72 Stunden postoperativ ein signifikanter Zusammenhang zur Entwicklung einer AKI, der auch nur noch für eine AKI Grad 2 oder 3 im post-Test bestätigt werden kann. Die Gabe von Milrinon zeigt in der statistischen Analyse nur intraoperativ für die Gruppe AKI 0 vs. AKI 1 ($p=0,036$) und 25-48h postoperativ für die Gruppe AKI 0 vs. AKI 2 & 3 ($p=0,002$) eine Signifikanz.

Parameter/Zeitraum	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Noradrenalin (höchster Wert) ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	0,174 ($\pm 0,11$)	0,252 ($\pm 0,175$)	0,258 ($\pm 0,17$)	0,004
1-24h postoperativ	0,145 ($\pm 0,129$)	0,254 ($\pm 0,261$)	0,345 ($\pm 0,278$)	< 0,0001
25-48h postoperativ	0,0471 ($\pm 0,08$)	0,098 ($\pm 0,1$)	0,233 ($\pm 0,206$)	< 0,0001
49-72h postoperativ	0,014 ($\pm 0,045$)	0,063 ($\pm 0,112$)	0,22 ($\pm 0,27$)	< 0,0001
Adrenalin (höchster Wert) ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	0,031 ($\pm 0,249$)	0,022 ($\pm 0,047$)	0,049 ($\pm 0,078$)	0,921
1-24h postoperativ	0,007 ($\pm 0,029$)	0,046 ($\pm 0,074$)	0,078 ($\pm 0,085$)	< 0,0001
25-48h postoperativ	0,002 ($\pm 0,012$)	0,022 ($\pm 0,039$)	0,05 ($\pm 0,066$)	< 0,0001
49-72h postoperativ	0,001 ($\pm 0,008$)	0,013 ($\pm 0,029$)	0,033 ($\pm 0,064$)	< 0,0001
Dobutamin (höchster Wert) ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	5,78 ($\pm 4,24$)	6,64 ($\pm 4,34$)	7,17 ($\pm 3,28$)	0,372
1-24h postoperativ	4,23 ($\pm 4,19$)	3,82 ($\pm 3,95$)	5,92 ($\pm 5,56$)	0,316
25-48h postoperativ	1,51 ($\pm 2,69$)	1,04 ($\pm 2,52$)	5,88 ($\pm 6,01$)	< 0,0001
49-72h postoperativ	0,55 ($\pm 1,64$)	0,79 ($\pm 2,05$)	4,21 ($\pm 6,11$)	< 0,0001
Milrinon (höchster Wert) ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	0,059 ($\pm 0,142$)	0,157 ($\pm 0,313$)	0,133 ($\pm 0,155$)	0,036
1-24h postoperativ	0,054 ($\pm 0,098$)	0,071 ($\pm 0,1$)	0,123 ($\pm 0,145$)	0,070
25-48h postoperativ	0,027 ($\pm 0,072$)	0,06 ($\pm 0,095$)	0,108 ($\pm 0,116$)	0,002
49-72h postoperativ	0,019 ($\pm 0,056$)	0,039 ($\pm 0,072$)	0,058 ($\pm 0,091$)	0,053

Tabelle 27: Mittelwerte für vaso- und kardioaktive Medikamente

Aufgeführt sind die pro AKI-Gruppe im Durchschnitt verabreichten Dosierungen an Katecholaminen und kardioaktiven Substanzen in den angegebenen Zeitspannen. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, die Konfidenzintervalle durch Bonferroni's post-Test. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ = Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute, h = Stunde.

Die Analyse der Maximalwerte der Herzfrequenz zeigt zwar zu den Zeitpunkten intraoperativ ($p=0,014$), 1-24h postoperativ ($p=0,001$) und 49-72h ($p=0,006$) postoperativ in der

Varianzanalyse eine Signifikanz an (s. Tabelle 28), diese kann jedoch jeweils nur für die Gruppe AKI 1 im post-Test bestätigt werden. Bei den Minimalwerten des arteriellen Mitteldrucks (MAD) zeigt sich zum letzten postoperativen Zeitpunkt zwar ein signifikanter p-Wert ($p=0,009$), welcher im post-Test jedoch nicht bestätigt werden kann.

Parameter/Zeitraum	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
Herzfrequenz (höchster Wert) (bpm) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	94,7 ($\pm 15,2$)	103 ($\pm 16,3$)	99,6 ($\pm 11,3$)	0,014
1-24h postoperativ	96 ($\pm 14,3$)	107 ($\pm 16,4$)	98,1 ($\pm 10,1$)	0,001
25-48h postoperativ	95,4 ($\pm 18,4$)	103 ($\pm 22,9$)	103 ($\pm 14,5$)	0,096
49-72h postoperativ	93,8 ($\pm 20,2$)	106 ($\pm 24,4$)	109 ($\pm 32,7$)	0,006
Arterieller Mitteldruck (niedrigster Wert) (mmHg) (Mittelwert \pm SD)				
Intraoperativ	65,6 ($\pm 7,46$)	65,3 ($\pm 7,6$)	66,9 ($\pm 10,2$)	0,804
1-24h postoperativ	59,9 ($\pm 7,79$)	57,3 ($\pm 8,5$)	61,7 ($\pm 7,1$)	0,159
25-48h postoperativ	64,2 ($\pm 8,5$)	62,2 ($\pm 7,66$)	62,7 ($\pm 9,11$)	0,471
49-72h postoperativ	66,9 ($\pm 9,22$)	62,1 ($\pm 10,4$)	60,3 ($\pm 9,41$)	0,009

Tabelle 28: Mittelwerte für Hämodynamik-Parameter

Aufgeführt werden die Mittelwerte für die Herzfrequenz und für den arteriellen Mitteldruck pro AKI-Gruppe jeweils in den angegebenen Zeiträumen. Dabei wurde für die Herzfrequenz der jeweils höchste Wert pro Patienten im angegebenen Zeitraum zur Analyse verwendet. Für den arteriellen Mitteldruck wurde der jeweils niedrigste Wert pro Patienten im angegebenen Zeitraum verwendet. Die Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) und die p-Werte wurden mittels *one-way* ANOVA und Bartlett's Test für gleiche Varianz berechnet, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, bpm = *beats per minute*/Schläge pro Minute, mmHg = Millimeter Quecksilbersäule, h = Stunde.

3.4.8 Kardiale Laborparameter

Im Hinblick auf etablierte kardiale Schädigungsmarker wurden Creatinkinase (CK), CK-MB und Troponin analysiert. Hierbei zeigt sich für die CK zum Zeitpunkt t_{72} ein signifikanter Zusammenhang zu Entstehung einer AKI ($p=0,004$, s. Tabelle 29), die im post-Test für die Gruppe AKI 2 & 3 bestätigt werden kann (KI (t_{72}) AKI 0 vs. AKI 1 [-1156 bis 554], AKI 0 vs. AKI 2&3 [-2920 bis -475]). Für die CK-MB zeigt sich zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang zur Entstehung einer AKI, wobei für die Zeitpunkte präoperativ und t_0 nicht genügend Daten für eine statistische Auswertung vorhanden waren ($n(t_{\text{prä}})=10$; $n(t_0)=15$). Die Auswertung der Troponin-Werte zeigt zu allen Zeitpunkten eine hohe Signifikanz ($t_{\text{prä}}$ $p=0,0002$; t_0 $p=0,007$; t_{24} $p=0,001$; t_{48} $p<0,0001$; t_{72} $p=0,0002$; s. Tabelle 29), die auch für

alle Zeitpunkte im post-Test für die Gruppe AKI 2 & 3 bestätigt werden kann. Darüber hinaus findet sich diese Bestätigung im post-Test auch für die Gruppe AKI 1 zum Zeitpunkt t_{48} .

Parameter/Zeitpunkte	AKI 0	AKI 1	AKI 2 & 3	p-Wert
CK (U/l) (Mittelwert \pm SD)				
Präoperativ	119 (\pm 101)	85 (\pm 64)	81 (\pm 44)	0,107
t_0	513 (\pm 635)	584 (\pm 601)	493 (\pm 282)	0,822
t_{24}	970 (\pm 1296)	789 (\pm 723)	711 (\pm 325)	0,591
t_{48}	718 (\pm 1132)	987 (\pm 2259)	1844 (\pm 4349)	0,129
t_{72}	419 (\pm 805)	720 (\pm 1639)	2116 (\pm 4600)	0,004
CK-MB (U/l) (Mittelwert \pm SD)				
Präoperativ	31 (\pm 30)	24 (\pm 0)	21 (\pm 0)	k. A.
t_0	45 (\pm 24)	88 (\pm 52)	0 (\pm 0)	k. A.
t_{24}	44 (\pm 23)	48 (\pm 42)	45 (\pm 18)	0,783
t_{48}	30 (\pm 16)	33 (\pm 24)	46 (\pm 43)	0,080
t_{72}	23 (\pm 18)	29 (\pm 29)	34 (\pm 30)	0,304
Troponin (ng/l) (Mittelwert \pm SD)				
Präoperativ	66 (\pm 177)	91 (\pm 193)	651 (\pm 1488)	0,0002
t_0	799 (\pm 942)	955 (\pm 976)	1940 (\pm 2745)	0,007
t_{24}	861 (\pm 915)	1479 (\pm 1733)	2109 (\pm 2145)	0,001
t_{48}	470 (\pm 456)	972 (\pm 969)	1621 (\pm 1927)	< 0,0001
t_{72}	398 (\pm 376)	7631 (\pm 837)	1265 (\pm 1685)	0,0002

Tabelle 29: Mittelwerte für die laborchemischen kardialen Marker

Mittelwerte der klinischen kardialen Labormarker zu den fünf untersuchten Zeitpunkten. Es wurden CK, CK-MB und Troponin als klinisch relevante Laborwerte für die Analyse ausgewählt. Die Mittelwerte sind mit der jeweiligen Standardabweichung (SD) angegeben, die p-Werte wurden nach ANOVA und Bartlett's post-Test bestimmt, p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. AKI = *acute kidney injury*/Akute Nierenschädigung, SD = Standardabweichung, CK = Creatinkinase, CK-MB = Creatinkinase *muscle-brain-band*, U/l = Units pro Liter, ng/l Nanogramm pro Liter, k. A. = keine Angabe.

4 Diskussion

In dieser Studie wurden insgesamt 148 Patienten nach kardiochirurgischer Operation daraufhin untersucht, ob sie eine AKI entwickelten und mit welchen Parametern dies einherging. Hierfür wurden im Plasma der Patienten zu vier verschiedenen Zeitpunkten die Konzentrationen der MicroRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c ermittelt und eine Untersuchung des Urins hinsichtlich

der Konzentration von TIMP-2 und IGFBP7 durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene klinische Parameter erhoben und analysiert, ob sie in einen signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung einer AKI zeigen.

Im folgenden Teil möchte ich mich kritisch mit der Durchführung der Studie, die dieser Dissertation zugrunde liegt, und den Stärken und Schwächen der in dieser Studie angewendeten Methoden auseinandersetzen sowie die Ergebnisse interpretieren und in Kontext zur aktuellen Forschung bringen.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Studiendesign

Die Auswahl und Rekrutierung des Patientenkollektivs erfolgte an einem Zentrum durch erfahrene Intensivmediziner (Ober- und Fachärzte). Die Patienten, die sich am nächsten Tag einer kardiochirurgischen Operation unterziehen sollten, wurden präoperativ bezüglich vorhandener Risikofaktoren für eine AKI evaluiert. Dazu wurden die Patienten-bezogenen Risikofaktoren (s. 1.1.2) wie Alter, Vorerkrankungen und präoperative Laborwerte herangezogen.

Insgesamt wurden so 148 Patienten in die Studie eingeschlossen, was für eine solche Pilot-Studie zwar eine relativ große Stichprobe darstellt, im Rahmen einer umfänglichen Studie aber absolut gesehen eine eher geringe Patientenzahl abbildet. Der Anteil an Patienten mit AKI hingegen liegt über der in anderen Studien angegebenen Inzidenz. Mit 46 Patienten mit AKI liegt die Studienkohorte deutlich über dem bei 148 Patienten und einer angegebenen Inzidenz von CSA-AKI von 22,3% erwarteten Anteil von 33 Patienten. Auch die Anzahl der Patienten mit höhergradiger AKI ist mit 13 über dem erwarteten Anteil von 10 Patienten [87]. Dies liegt am ehesten darin begründet, dass wie oben beschrieben aktiv Patienten mit einem erhöhten AKI-Risiko für diese Studie ausgewählt wurden.

Bei der statistischen Auswertung gab es, z. B. durch die relativ kleine Patientengruppe mit schwerer AKI, Ergebnisse, die in dieser Studie zwar nicht signifikant waren, aber Tendenzen für ein gehäuftes Auftreten bei Patienten mit postoperativer AKI zeigten, wie beispielsweise ein bekannter Diabetes mellitus Typ II oder ein erhöhter BMI (s. Kapitel 3.1.3).

Im Auswahlprozess können zwei Einflussfaktoren als eventuelle *Confounder* liegen. Zum einen erfolgt eine örtliche Selektion, die also unmöglich eine repräsentative Probe für die deutsche Gesamtbevölkerung oder gar die Weltbevölkerung darstellen kann. Der zweite mögliche

Confounder ist die Auswahl durch erfahrene Ärzte und nicht etwa ein randomisiertes Auswahlverfahren.

Da diese Studie sich nur auf AKI nach kardiochirurgischen Operationen beschränkt, wird nur eine Untergruppe aller AKI-Patienten betrachtet. Andere häufige Auslöser für eine AKI wie z. B. Sepsis, der häufigste Grund für eine AKI, werden hier nicht mit einbezogen [4]. Andererseits kommen durch weitere mitbetrachtete Auslöser auch andere Einflussfaktoren ins Spiel, die die Ergebnisse der Studie wiederum beeinflussen können. Mit der Beschränkung auf ein Patientenkollektiv hat man so möglicherweise präzisere Ergebnisse für die untersuchte Kohorte.

Der Beobachtungszeitraum für die Expressionsdynamik der miRNAs in dieser Studie betrug 72 Stunden, beschränkte sich also auf die Entstehung einer akut postoperativ auftretenden AKI. Ein Auftreten einer AKI ist auch nach diesem Zeitraum nicht auszuschließen, so identifizierten Hoste et al. in einer Übersichtsarbeit eine frühe CSA-AKI innerhalb der ersten sieben Tage postoperativ und eine späte CSA-AKI innerhalb von 30 Tagen nach der Operation [88]. Deshalb könnte es für spätere Studien Sinn ergeben, einen längeren Beobachtungszeitraum von z. B. 7 Tagen zu wählen, welcher auch bei der Einteilung der AKI-Stadien nach KDIGO angewendet wird [1]. Darüber hinaus könnte eine Studie zur Untersuchung einer späten AKI wie oben beschrieben einen Zeitraum von 30 Tagen umfassen, um in etwa auch einen Unterschied zwischen früh und spät Erkrankten zu untersuchen. Da bei einer CSA-AKI allerdings die kardiochirurgische Operation als einer der größten Faktoren für eine Nierenschädigung gilt, ist das Auftreten einer CSA-AKI vor allem in der frühen postoperativen Phase zu erwarten. Weil die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen auf die frühe Erkennung einer AKI abzielen, ist deshalb der gewählte Beobachtungszeitraum für die Analyse der miRNAs mit 72 Stunden postoperativ passend gewählt.

4.1.2 *Next Generation Sequencing (NGS)*

Das zur Analyse der in den Proben vorhandenen microRNAs verwendete NGS diente zur Identifikation von microRNAs, die unterschiedlich zwischen den Patientengruppen mit und ohne AKI im Plasma der postoperativen Patienten vorhanden waren. Hierdurch sollten möglichst spezifische Kandidaten aus der großen Anzahl an microRNAs ausgewählt werden können für eine zielgerichtete experimentelle Untersuchung mittels quantitativer PCR. Das Verfahren ist insgesamt noch relativ neu (die ersten Varianten des NGS kamen Anfang der 2000er Jahre auf den Markt [89]), konnte aber bereits in mehreren Studien als eigenständig

aussagekräftiges Verfahren validiert werden [90-92]. Die bisher als Goldstandard geltende Sequenzierung nach Sanger aus dem Jahr 1977 zeigt dabei keinen Vorteil bei der Genauigkeit der Sequenzierung und ist deutlich zeitaufwändiger [91].

Durch den hohen Durchsatz an Material und die detaillierten Ergebnisse zu allen nachgewiesenen miRNAs, bieten sich durch das NGS Möglichkeiten, neue Biomarker-Kandidaten für die Diagnostik unterschiedlichster Krankheiten zu identifizieren. So gibt es auch in der für die MiRAKI-Studie durchgeführten Analyse miRNAs, die anhand der Ergebnisse des NGS genauer analysiert werden könnten (vgl. 3.2) [81], auch wenn die Analyse dieser weniger stark exprimierten miRNAs eigene Herausforderungen stellt. Das NGS sollte folglich vor allem als *Screening*-Instrument genutzt werden, um geeignete, für das untersuchte Krankheitsbild möglichst spezifische Kandidaten für eine weitere, genauere Analyse zu identifizieren.

Eine Limitierung stellt hier die relativ kleine Stichprobe von 6 Patienten je Untersuchungsgruppe (Patienten mit und ohne AKI) für das NGS dar. Durch das Abgleichen der Patientengruppen hinsichtlich der Patienten- und Eingriffscharakteristika wie Alter, Komorbiditäten und Eingriffsart wurde hier allerdings versucht, möglichst viele Störfaktoren herauszufiltern. Da wir uns neben den Ergebnissen des NGS auch auf aktuelle Literatur für die Auswahl der miRNAs konzentriert haben, sollte die Auswahl der in der MiRAKI-Studie analysierten miRNAs keine Schwäche dieser Studie darstellen.

4.1.3 Methoden und verwendete qPCR

Die qPCR wird in der Forschung unter anderem angewendet, um den RNA- oder DNA-Gehalt in verschiedenen Proben zu bestimmen und durch die Analyse etwaiger Unterschiede Rückschlüsse auf physiologische und pathologische Prozesse ziehen zu können. Die Analyse von miRNAs stellt dabei aufgrund ihrer geringen Größe (ca. 20-23 bp, vgl. 1.2.1) eine Herausforderung für die qPCR dar, da normalerweise genutzte Primer häufig schon ca. 20 bp lang sind. Daher wurden bereits verschiedene miRNA-spezifische qPCR-Methoden entwickelt, welche die miRNAs auf verschiedene Weisen verlängern, um eine zuverlässige Bindung der Primer und damit eine zuverlässige Transkription der miRNAs in der PCR zu ermöglichen [93]. Durch ihre kurze Struktur haben reife miRNAs einen sehr variablen und häufig geringen Gehalt an GC-Bindungen, die zum einen dazu führen, dass die Schmelztemperaturen (T_m) stark variieren können [76], und zum anderen dazu, dass bereits bei der Isolierung der miRNAs Verfälschungen der Ergebnisse z. B. durch den Einsatz von Trizol entstehen können [94].

Zusätzlich unterscheiden sich manche miRNAs nur in einem einzelnen Nukleotid voneinander, was eine spezifische Detektion weiter erschweren kann [76].

Das in dieser Studie verwendete Protokoll für die qPCR ist eine relativ neue Methode, die miQPCR. Diese Methode wurde 2014 von Benes et al. entwickelt und soll eine kostengünstige und einfach an verschiedene miRNAs anzupassende Alternative zu anderen qPCR-Protokollen bieten. Sie verwendet einen universellen miLINKER, der an die miRNAs geheftet wird und eine Ansatzstelle für die miRNA-spezifischen Primer bietet. Die Vorteile dieses Protokolls sind eine hohe Flexibilität, eine hohe Sensitivität und Spezifität und geringere Kosten [76]. Da bei der miQPCR die zu messenden miRNAs durch den miLINKER um einige Nukleotide verlängert werden, kann man durch spezielle Kürzungen oder Verlängerungen der Primer-Sequenz die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer für die qPCR optimieren und damit die Spezifität und Sensitivität optimieren [76].

Ein Nachteil der Methode ist, dass sie noch nicht in vielen Studien verwendet wurde, wie es z. B. bei der TaqMan-qPCR der Fall ist. Daher könnte man in Frage stellen, ob die mit dieser qPCR in der MiRAKI-Studie bestimmten Werte mit einer anderen PCR-Methode reproduzierbar sind. In der Pilotstudie zur Evaluation der miQPCR von Benes et al. wurden die Ergebnisse in der miQPCR verschiedener miRNAs mit den Ergebnissen der etablierten TaqMan-qPCR verglichen. Teil dieser Validierung waren auch die in dieser Studie analysierten miRNAs miR-1 und miR-21. Im Vergleich von miQPCR und TaqMan-qPCR zeigte sich kein Unterschied in den Ergebnissen, wobei die miQPCR mit weniger Ausgangsmaterial arbeiten konnte [76]. Diese Ergebnisse lassen eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Verwendung des miQPCR-Protokolls sehr unwahrscheinlich erscheinen.

Das Design der Primer unterliegt dem Risiko, dass eine Hybridisierung mit ggf. bisher noch nicht bekannten miRNAs theoretisch möglich sein könnte. Daher wurden die designten Primer mit einer großen Datenbank (mirbase.org [39]) abgeglichen, die alle aktuell bekannten miRNAs im Menschen enthält. Aufgrund dieser Kontrolle der Primer-Sequenzen ist die Möglichkeit einer Überschneidung mit anderen miRNAs höchst unwahrscheinlich.

Zur Kontrolle innerhalb der Versuchsansätze wurden auf jeder PCR-Platte intrinsische Kontrollen in Form einer Analyse von miR-16 und cel-miR-39 in einer identischen Probe, die über alle durchgeführten Versuchsansätze gleich war, durchgeführt. Zusätzlich wurde zum Ausschluss von Verunreinigungen eine Nullprobe mit RNase-freiem Wasser durchgeführt. Insgesamt gab es bei der Durchführung der qPCR mit den intrinsischen Kontrollen keine offensichtlichen Probleme, was für eine gute Validität der Daten spricht.

Die einzige Ausnahme hierbei stellen die pro Durchlauf der RNA-Isolierung unterschiedlichen C_t -Werte für die cel-miR-39 dar. Dabei betrug der Mittelwert der C_t -Werte der cel-miR-39 über alle Patientenproben 22,45 (SD $\pm 4,21$). Der Mittelwert der C_t -Werte der cel-miR-39 in den Poolproben betrug 23,41 (SD $\pm 0,27$). Da bei jedem Durchlauf der RNA-Isolierung die gleiche Menge an cel-miR-39 dem Probenansatz hinzugefügt wurde, wäre zu erwarten gewesen, dass die C_t -Werte über alle Patientenproben entsprechend gleich ausfallen. Die geringe Standardabweichung bei der Poolprobe spricht gegen ein relevantes Problem bei der qPCR selbst, aber die Abweichungen bei den C_t -Werten der cel-miR-39 in den Patientenproben können verschiedene Gründe haben. Diese könnten z. B. durch Ungenauigkeiten beim Pipettieren im RNA-Isolations-Schritt zustande gekommen sein, die für das bloße Auge nicht erkennbar waren. Da ansonsten keine Probleme mit der Methode beziehungsweise in den eingesetzten Kontrollen zu finden waren, kam die Normalisierungsmethode wie oben beschrieben zum Einsatz (s. Kapitel 3.3), um die Ergebnisse der qPCR-Durchläufe vergleichbar zu machen. Dafür wurden die C_t -Werte der cel-miR-39 von den C_t -Werten der untersuchten miRNAs des jeweiligen Patienten auf der gleichen PCR-Platte subtrahiert ($\Delta C_t(\text{miR-xx})_{(\text{Pat. x tx})} = C_t(\text{miR-xx})_{(\text{Pat. x tx})} - C_t(\text{cel-miR-39})_{(\text{Pat. x tx})}$) und die C_t -Werte der untersuchten Proben dadurch genormt.

Dieses Vorgehen ist aufgrund der relativ neuen Methode noch nicht standardisiert, allerdings konnten Binderup et al. zeigen, dass eine Normalisierung zu einer intrinsischen Kontrolle wie der cel-miR-39 valide Ergebnisse liefert [95]. Dabei wird klassischerweise die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode genutzt, wobei $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Kontrollgen}})_{\text{Zeitpunkt X}} - (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Kontrollgen}})_{\text{Zeitpunkt 0}}$. Diese Methode zielt darauf ab, die PCR-Ergebnisse zum einen gegen eine interne Kontrolle („Kontrollgen“) zu normieren und zum anderen gegen einen Ausgangszeitpunkt („Zeitpunkt 0“) [96]. Ein möglicher Ausgangszeitpunkt wäre in dieser Studie z. B. präoperativ gewesen, der aber leider aus Kostengründen nicht mittels qPCR analysiert werden konnte. Da wir uns in dieser Studie auf den postoperativen Verlauf konzentrieren und mit einem exogen zugeführten Kontrollgen arbeiten, wurde die leicht abgewandelte ΔC_t -Methode verwendet, bei der nur gegen ein Kontrollgen (in diesem Fall die cel-miR-39) genormt wird. Ein Vorteil dabei ist, dass die exogen zugeführte Kontrolle nicht durch die untersuchten Einflussfaktoren (u. a. Operation, Komorbiditäten) beeinflusst wird. So konnten Vigneron et al. bestätigen, dass die Normalisierung mit einem endogenen Kontrollgen ebenso gut bei der Variabilität zwischen Messungen der gleichen Probe funktioniert, wie eine exogene Kontrolle. Jedoch war die Kontrolle zwischen verschiedenen Proben mit der exogenen Kontrolle überlegen, was also eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Proben impliziert [97].

McDonald et al. verglichen 2011 verschiedene exogene Kontrollen, darunter auch die cel-miR-39. Dabei zeigten sie, dass der größte Anteil an *Intra-Assay*-Varianz, also der Varianz innerhalb eines Versuchsansatzes, vom Schritt der RNA-Extraktion ausgeht [98].

Die in dieser Studie angewandte Normalisierung mittels cel-miR-39 wurde auch in weiteren Studien angewendet, dabei ist jedoch anzumerken, dass die Normalisierung abhängig davon, ob es sich um eine exogene (wie in dieser Studie) oder endogene Kontrolle handelt, auch einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann [99]. Da in dieser Studie nur Ergebnisse innerhalb der Studie mit jeweils gleicher Normierung verglichen wurden, sollte dieser Effekt aber keine Rolle spielen.

Trotz alledem bedarf es für Studien wie dieser einer entsprechend präzisen Ausführung über die durchgeführten Materialien und Methoden, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

4.2 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten möchte ich die Ergebnisse der Studie interpretieren und diskutieren. Dabei will ich sie zueinander und mit der aktuellen Forschung und Anwendungen im klinischen Alltag in Kontext bringen.

4.2.1 qPCR

Um die Frage zu beantworten, ob sich der Gehalt von miR-1, miR-21-5p und miR-29c-3p im Plasma von kardiochirurgisch operierten Patienten mit AKI im Vergleich zu solchen ohne AKI unterscheidet, wurden diese miRNAs bei 148 Patienten mittels qPCR untersucht.

Die **miR-1** wurde in der bisherigen Forschung oft in Zusammenhang mit physiologischen Prozessen gebracht, darunter z. B. die Entwicklung von Herzmuskelgewebe während der Embryogenese [100]. Sie greift in die Transkription einiger verschiedener Gene ein und spielt dadurch auch bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle, bei denen die miR-1 vermehrt oder in geringerer Konzentration vorkommt [101]. Dazu zählen u. a. Myokardinfarkte, Multiple Sklerose, Leberkarzinome und Nierenzellkarzinome [101, 102].

Bereits in mehreren Forschungsarbeiten wurde die miR-1 als Biomarker vorgeschlagen. 2016 untersuchten Vagner et al. die miR-1 als Marker für eine Kardiotoxizität durch Doxorubicin bei Brustkrebspatientinnen und konnten zeigen, dass die Plasma-Spiegel von miR-1 in der Patientengruppe mit relevanter Kardiotoxizität, gemessen durch eine Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion, unterscheiden konnten [103]. Daraus schlussfolgerten sie,

dass eine Messung der miR-1 während der Chemotherapie mögliche kardiotoxische Nebenwirkungen anzeigen kann, bevor irreversible Schäden auftreten [103]. Einen Zusammenhang der miR-1 zur Nierenschädigung zeigten u. a. Zhao et al. 2021, als sie angereicherte exosomale miR-1 aus Ratten mit Myokardinfarkt isolierten und in Ratten, die eine Kontrastmittel-induzierte AKI bekamen, transferierten. Dabei zeigte die Gruppe mit der verabreichten exosomal miR-1 eine signifikant geringere Nierenschädigung mit geringerer Fibrose und besserer Nierenfunktion [104].

Sowohl Erhöhungen als auch Erniedrigungen der miR-1-Plasma-Spiegel bei kardialer Schädigung wurden bereits beschrieben [101], anhand des untersuchten Patientenkollektivs wäre aber eher eine verringerte Expression der miR-1 zu erwarten gewesen, da in anderen Studien an Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz die Schwere der Symptome mit sinkenden miR-1-Spiegeln korrelierte [105]. Ebenfalls würde die Studie von Zhou et al., in der niedrigere exosomale miR-1-Spiegel bei Ratten mit einer stärkeren Nierenschädigung einhergingen [104], eher niedrigere Mengen der miR-1 bei Patienten mit stärkerer Nierenschädigung erwarten lassen.

Entsprechend dieser Erwartungen sinkt die durchschnittliche Menge der miR-1 in der MiRAKI-Studie tendenziell im postoperativen Verlauf aller hier untersuchten Patientengruppen über den Beobachtungszeitraum, was für einen Zusammenhang mit dem OP-Trauma sprechen könnte. Insgesamt zeigt sich in dieser Studie allerdings kein signifikanter Unterschied in der postoperativen Expression der miR-1 zwischen der Patientengruppe ohne AKI und der Patientengruppe mit Entwicklung einer AKI. Daher lässt sich kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Konzentration der miR-1 im Plasma und der Entwicklung einer AKI feststellen. Warum sich die Erwartung in unseren Untersuchungen nicht mit signifikanten Ergebnissen bestätigt, kann zahlreiche Gründe haben. Relevante Einflussfaktoren könnten hier der individuelle Umfang des Operationstraumas selbst, die präoperative Nierenfunktion oder das präoperative Ausmaß der kardialen Symptomatik sein. Für eine Evaluation der relativen Expression vor und nach kardiochirurgischer Operation fehlt in dieser Studie die Messung der präoperativen miR-1-Expression, die eventuell deutlichere Ergebnisse liefern könnte.

Da die miR-1 bereits in früherer Literatur unter anderem im Zusammenhang mit der Entwicklung von Muskelzellen und insbesondere Kardiomyozyten z. B. nach ischämischer Herzschiädigung beschrieben wird [106], kann darüber hinaus eine weitere Untersuchung im Hinblick auf kardiale Schädigungen mit einer neuen Studie, die auf das kardiale Outcome fokussiert ist, Sinn machen. In einer Studie von Ma et al. wurde die miR-1 auch als potenzieller

prädiktiver Marker für einen Umbau des Herzmuskelgewebes mit verschlechterter linksventrikulärer Funktion nach Herzinfarkt identifiziert [107]. Hier zeigt sich das breite Potential von miRNAs nicht nur im diagnostischen, sondern auch im präventiven Bereich.

miR-21 ist eine miRNA, die in den letzten Jahren häufig im Zusammenhang mit Pathologien der Niere untersucht und in Zusammenhang gebracht wurde [3]. Im Tiermodell sind erhöhte Spiegel der miR-21 im Plasma bei diabetischer Nephropathie mit einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion, vermehrter Fibrose und einer signifikanten Funktionsverschlechterung wie z. B. erhöhter Albuminurie in Zusammenhang gebracht worden [53, 108]. Gleichzeitig konnte man mit miR-21-Antagonisten diese Effekte verringern und eine langfristige Verbesserung der Nierenfunktion bei Mäusen mit diabetischer Nephropathie erzielen [108]. Auch beim Menschen scheint die miR-21 eine Rolle beim Gewebeumbau der Niere zu spielen. Bei Patienten mit ausgeprägter Nierenfibrose, die deshalb eine Nierentransplantation benötigten, konnten Glowacki et al. signifikant erhöhte Plasma-Spiegel der miR-21 im Vergleich zu Patienten mit normaler Nierenfunktion beobachten [109]. Im Gegensatz dazu beobachteten Hu et al., dass bei Mäusen mit Ischämie-Reperfusionsschädigung (*ischemia reperfusion injury*, IRI) ein protektiver Effekt bei höheren Plasma-Spiegeln der miR-21 überwog und durch antiapoptotische Eigenschaften zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führte [110]. Diese scheinbar gegensätzliche Funktion der miR-21 bei Nierenschädigungen führte Larrue et al. in ihrer Übersichtsarbeit zu der Theorie, dass die miR-21 im Rahmen einer akuten Nierenschädigung wie einer IRI eine Art Gewebe-Reparatur durch Zellproliferation und antiapoptotische Signalwege vermittelt und diese Mechanismen bei einer anhaltenden Schädigung wie z. B. einer diabetischen Nephropathie auf Dauer zu einem Gewebeumbau führen, der die Nierenfunktion beeinträchtigt [82].

Entsprechend wäre in der MiRAKI-Studie insgesamt eher eine Anreicherung der miR-21 zu erwarten, da Patienten mit einer akuten Nierenschädigung untersucht wurden. In den Ergebnissen der Messung der miR-21 besteht bei den untersuchten Patienten am Zeitpunkt t_{24} ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression der miR-21 und der Entwicklung einer AKI Grad 2 oder 3. Diese vermehrte Expression ist in dieser Studie zwar nicht an allen Zeitpunkten signifikant, in den Ergebnissen lässt sich aber erkennen, dass bei Patienten mit höhergradiger AKI tendenziell insgesamt eine höhere Expression der miR-21 postoperativ vorliegt. Diese vermehrte Expression nach kardiochirurgischer Operation könnte möglicherweise eine Reaktion auf das Ausmaß der Schädigung sein und daher abhängig vom

AKI-Stadium. Hier wäre ein Vergleich mit präoperativen Ausgangswerten interessant, um zu eruieren, ob bereits unmittelbar nach der Schädigung, also am Zeitpunkt t_0 , eine abhängig vom AKI-Stadium vermehrte Expression der miR-21 im Vergleich zu vor der Schädigung vorliegt. In einer Studie von Gaede et al., die der MiRAKI-Studie in Aufbau und Studienkohorte ähnelt, war die präoperativ bestimmte Expression der miR-21 in Patienten, die nach einer kardiochirurgischen Operation eine höhergradige AKI entwickelten, signifikant niedriger als bei den Patienten ohne AKI [60]. Da die Patienten bei Entwicklung einer AKI in der Studie eine deutlich gesteigerte Mortalität aufwiesen, demonstriert dieses Ergebnis das hohe Potential, das die miR-21 als Biomarker auch zur Abschätzung der Prognose bzw. Verbesserung des Outcomes für Patienten birgt [60].

Aber auch für andere in der Studienkohorte der MiRAKI-Studie relevante Krankheitsbilder gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung durch die miR-21. So zeigten Sadat-Ebrahimi et al. 2022, dass eine Ischämie-bedingte akute Herzinsuffizienz mit signifikant niedrigeren Plasma-Spiegeln der miR-21 einherging [111]. Bei einer Studie an pädiatrischen Patienten mit Sepsis von Wu et al. zeigten die Patienten, die eine AKI entwickelten, signifikant höhere Spiegel an miR-21 [112]. Dies sind weitere Beispiele dafür, dass die miR-21 bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer AKI assoziiert sein können, anders als bei Gesunden exprimiert wird.

Perspektivisch wäre es interessant zu untersuchen, ob sich z. B. bei Patienten mit Erholung nach AKI die Menge an exprimierter miR-21 im Vergleich zu Patienten mit bleibender Nierenschädigung signifikant unterscheidet. Einen Hinweis auf eine vermehrte Expression in der Erholungsphase nach Nierenschädigung legten Kaucsár et al. vor. Im Rattenmodell zeigten sie eine signifikante Steigerung der Expression u. a. der miR-21 über die Akutphase hinaus für mehrere Tage, vor allem auch, wenn die Nierenfunktion sich wieder erholte [113].

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der MiRAKI-Studie im Einklang mit der bisher in verschiedenen Studien getroffenen Annahme, dass eine akute Nierenschädigung mit einer erhöhten Expression von miR-21 im Plasma einhergeht. Da diese miRNA allerdings an zahlreichen verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist, muss bei der Evaluierung als Biomarker für eine AKI in zukünftigen Studien auf verschiedene Einflussfaktoren geachtet werden, um die bisher antizipierten Möglichkeiten der miR-21 für Diagnostik und auch Therapie realistisch abzuschätzen.

Die **miR-29c-3p** ist Teil der micro-RNA-29-Familie, die bei zahlreichen Prozessen wie u. a. dem Glukose-Stoffwechsel und diabetischen Langzeitschäden wie Fibrose verschiedener Organe,

einschließlich der Niere, eine Rolle spielt [114]. Die miR-29c im Besonderen spielt bei verschiedensten Krankheitsbildern eine Rolle. Cao et al. konnten 2021 im Tiermodell zeigen, dass bei Morbus Alzheimer die Expression der miR-29c im betroffenen Gewebe erniedrigt war und diese reduzierte Expression zum Fortschreiten der Krankheit beitrug [115]. Auch in verschiedenen Arten von Karzinomen scheint die miR-29c eine Rolle zu spielen. In einer Studie von Wang et al. wurde an 30 Patienten mit Ösophagus-Karzinom die Expression im Tumorgewebe und im nicht befallenen Gewebe des Ösophagus bestimmt. Die miR-29c war im Tumorgewebe signifikant geringer konzentriert als im gesunden Gewebe und eine niedrigere Expression ging mit einer erhöhten Mortalität einher [116]. Auch in Patienten mit Ovarialkarzinomen war die miR-29c geringer exprimiert, wobei auch hier eine geringere Konzentration an miR-29c mit einer schlechteren Prognose korrelierte [117]. Auch in der Seneszenz, also dem Verlust der Teilungsfähigkeit, von mesenchymalen Stammzellen scheint die vermehrte Expression der miR-29c eine Rolle zu spielen [118]. Aber auch als Kontrollgen zur Normalisierung anderer analysierter Gene wurde die miR-29c schon evaluiert, so z. B. in einer Studie zu Blasen-Karzinomen. Dabei war die miR-29c sowohl in pathologischen als auch in gesunden Zellen konstant exprimiert, wodurch sie in der Studie von Oto et al. als Kontrollgen in diesem Kontext verwendet wurde [119]. Diese Eigenschaft zeichnet sich auch in den Ergebnissen der MiRAKI-Studie ab, da die miR-29c über alle Patientengruppen und Zeitpunkte von den hier untersuchten miRNAs am konstantesten und insgesamt relativ gleichbleibend exprimiert wurde.

Die Bedeutung der miR-29c bei Pathologien der Niere ist in der Vergangenheit häufig für die Fibrose beschrieben worden. In einer Studie von Wang et al. zeigte sich bei 43 Patienten mit IgA-Nephropathie ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer niedrigeren Expression von miR-29c und vermehrter Proteinurie sowie verringerter GFR [120]. Das Potential der miR-29c als Biomarker konnten Solé et al. beispielsweise für die Lupus-Nephritis zeigen. In ihrer Studie korrelierte eine erniedrigte Expression mit einer höheren Rate an Chronifizierung und glomerulärer Sklerose in der histologischen Untersuchung, was die miR-29c als Biomarker für einen frühen Progress der Fibrose bei Lupus-Nephropathie nutzbar machen könnte [121]. Explizit wurde der Zusammenhang der miR-29c mit dem TGF- β -Signalweg beschrieben, über den sie an der Inflammation und Fibrose des Nierenparenchyms beteiligt ist und durch Inhibierung oder Gabe von miR-29c-*mimics* diese Prozesse signifikant beeinflussen konnte [122, 123]. Zusammenfassend scheint die miR-29c also bei pathologischen Gewebeumbauprozessen wie Karzinomen oder Fibrose eine Rolle zu spielen.

In der hier durchgeführten Analyse hat die miR-29c keine Signifikanz im Zusammenhang mit der Entwicklung einer AKI aufgewiesen. Darüber hinaus wird sie bei Patienten mit AKI 1 im Vergleich zu den Patienten ohne AKI tendenziell geringer exprimiert, bei Patienten mit AKI 2 oder 3 wird sie aber zunächst vermehrt exprimiert und liegt erst am Zeitpunkt t_{72} unter dem Niveau der Patienten ohne AKI. Dies kann möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass eine verringerte Expression der miR-29c im Frühstadium einer AKI einen schwereren Verlauf verhindern kann. Da die Ergebnisse in dieser Studie zu dieser Theorie allerdings nicht signifikant sind, müsste man gegebenenfalls mit einer größeren Studie den Einfluss der miR-29c dahingehend weiter untersuchen.

Insgesamt ist bei allen untersuchten miRNAs eine Zunahme der relativen Expression über alle untersuchten Patientengruppen vom Zeitpunkt t_0 hin zum Zeitpunkt t_{72} zu sehen. Dies kann darauf deuten, dass miRNAs im postoperativen Stoffwechsel insgesamt eine Rolle spielen und in verschiedene Reparaturprozesse im Körper eingreifen. Daher ist es aber entsprechend schwierig spezifische miRNAs für Erkrankungen wie eine AKI mit ihren vielfältigen Auslösern und Einflussfaktoren zu identifizieren.

4.2.2 TIMP-2 und IGFBP7 im Urin

TIMP-2 und IGFBP7 sind Proteine, die über inhibierende Signalkaskaden wahrscheinlich daran beteiligt sind, die Zellteilung geschädigter Zellen zeitweise zu verhindern [30, 124]. Sie werden in den Urin sezerniert und sind dort messbar. Die genaue Rolle und Ursprung von TIMP-2 und IGFBP7 auf Zellebene ist noch nicht abschließend erforscht [20], ihr Einfluss bei verschiedenen pathologischen Prozessen wurde aber schon in verschiedenen Studien beschrieben. So evaluierten Ko et al. IGFBP7 im Zusammenhang mit einer Herzinsuffizienz und schlugen das Protein als validen Biomarker und perspektivisch sogar als therapeutisches Ziel vor [125]. Auch im Zusammenhang mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen wurde IGFBP7 als Teil verschiedener Signalkaskaden untersucht und als möglicher Biomarker oder als Ziel für neue Therapien identifiziert [126, 127], ebenso wie TIMP-2 [128]. Trotzdem liegt der Fokus der Forschung zu TIMP-2 und IGFBP7 eher auf ihrer Eigenschaft als Biomarker bei einer AKI.

Kashani et al. identifizierten 2013 das Produkt aus TIMP-2 und IGFBP7 als Biomarker für eine AKI [30]. Die zur Validierung ihrer Ergebnisse durchgeführte Sapphire-Studie wurde an kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation durchgeführt, ebenso wie die folgende Topaz-Studie

[30, 31], darunter auch Patienten nach größeren Operationen wie in der Studienkohorte der MiRAKI-Studie.

Seitdem wurden ihre Ergebnisse in mehreren Studien validiert, wobei eine Erhöhung von TIMP-2 und IGFBP7 im Urin Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI identifizieren konnte, auch wenn der optimale *cut-off*-Wert teilweise in den Studien diskutiert wurde [129]. Dabei wurde die Messung von TIMP-2 * IGFBP7 in der Regel innerhalb von 24 Stunden nach potenzieller Nierenschädigung bzw. Aufnahme auf der Intensivstation durchgeführt [130, 131]. Dieser Zeitraum wurde auch in den beiden Validierungs-Studien genutzt [30, 31]. Auch mit dem in der MiRAKI-Studie gewählten Messzeitpunkt bei Aufnahme auf der Intensivstation konnten die Ergebnisse von Kashani et al. reproduziert werden [131], was gegen eine relevante Limitierung der Ergebnisse durch die Messung am Zeitpunkt t_0 spricht. Der in der MiRAKI-Studie gewählte Zeitpunkt scheint also richtig gewählt zu sein. Messungen zu anderen Zeitpunkten sind nur in wenigen Studien durchgeführt worden, so stellten z. B. Esmeijer et al. fest, dass die präoperative Messung von TIMP-2 * IGFBP7 keinen Vorteil gegenüber einem Modell aus klassischen Laborparametern zur präoperativen Risikoevaluation von herzchirurgischen Patienten hatte [131]. Eine Nutzung als Screening-Test zur präoperativen Risikoevaluierung scheint daher weniger aussichtsreich, vermutlich weil der Test Proteine der Nierenschädigung misst, also keine zuverlässige Aussage vor der eigentlichen Organschädigung treffen kann.

Nach der Durchführung von Grubb's Test zur Identifizierung von statistischen Ausreißern wurde ein Ausreißer mit einem stark erhöhten Wert ($\text{TIMP-2} * \text{IGFBP7} / 1000 = 42,52$) in der Gruppe AKI 0 identifiziert und aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Als Grund für die ungewöhnliche Messung kommen verschiedene Möglichkeiten wie u. a. eine fehlerhaft durchgeführte Messung, technische Probleme oder patienteneigene Faktoren in Frage.

Bei der Analyse der Messung von IGFBP7 * TIMP-2 lässt sich in dieser Studie, entsprechend der Erwartung aus vorherigen Studien, eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Messwerten und der Entwicklung einer AKI feststellen ($p=0,022$).

Auch der in den Validierungs-Studien von Kashani et al. empfohlene *cut-off* zeigt in der Analyse der Patienten mit einem Wert von $\text{TIMP-2} * \text{IGFBP7} / 1000 > 0,3$ mittels *Fisher's exact test*, dass diese in unserer Studie ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AKI haben, man hierdurch also Risikopatienten identifizieren kann. Der *cut-off* von 0,3 bei der Messung von $\text{TIMP-2} * \text{IGFBP7} / 1000$ wurde auch in den initialen Validierungs-Studien mit einem stark ansteigenden Risiko für eine AKI assoziiert [30, 31]. Darüber hinaus konnten wir

auch für den von Bihorac in der Topaz-Studie untersuchten *cut-off* von >2 [31] eine signifikante Korrelation zu Entwicklung einer AKI in unserer Studienkohorte feststellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Analyse von TIMP-2 und IGFBP7 im Urin postoperativ als klinischer Test zur frühen Risikoevaluation für Patienten nach kardiochirurgischen Operationen eingesetzt werden kann und bestätigen damit nicht nur die Studienergebnisse von Kashani et al., sondern zeigen auch, dass die in der MiRAKI-Studie untersuchte Kohorte zur Beantwortung der Fragestellung gut geeignet war. Zudem zeigt sich verglichen mit den miRNAs im Plasma, die erst zum Zeitpunkt t_{24} eine signifikante Expressionsveränderung aufwiesen, dass IGFBP7 * TIMP-2 im Urin bereits an t_0 bei AKI-Patienten signifikant erhöht war und somit als frühzeitiger Marker für AKI vermutlich besser geeignet sein könnte. In zukünftigen Studien könnte diese Hypothese näher untersucht werden.

4.2.3 Patientencharakteristika und Komorbiditäten

In der Vergangenheit wurden verschiedene Risikofaktoren für eine Nierenschädigung identifiziert, die auch in der KDIGO-Leitlinie zur AKI berücksichtigt werden. Dabei gilt es die patientenbezogenen Risikofaktoren, die ein Patient z. B. durch Alter oder Komorbiditäten mitbringt, und die expositionsbezogenen Risikofaktoren, die zahlreiche, teils sehr verschiedene Faktoren wie Operationen oder Medikamentenexpositionen beinhalten, zu berücksichtigen [1].

Alter und weibliches Geschlecht sind bekannt als Risikofaktoren für die Entstehung einer AKI [132-134]. Allerdings zeigen die hier erhobenen unveränderlichen Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht oder Gewicht bzw. BMI keinen signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung einer AKI, haben also scheinbar keinen relevanten Einfluss auf die Entstehung einer kardiochirurgisch induzierten AKI. Hier könnte das ausgewählte Patientenkollektiv oder die Patientenzahl die Ergebnisse beeinflusst haben, sodass man diese Beobachtungen bei CSA-AKI in weiteren Studien mit ggf. größerer Patientenzahl verifizieren müsste.

Ebenso zeigt sich in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen den erhobenen Komorbiditäten der Patienten und der Entstehung einer AKI, auch wenn sich hier teilweise Tendenzen wie z. B. ein erhöhtes Risiko bei Vorhandensein eines Diabetes mellitus zeigen. Da ein Diabetes mellitus ein bekannter Grund für die Entstehung einer Nierenerkrankung ist [135], stellt sich hier die Frage, wie groß der Einfluss auf eine CSA-AKI ist und ob sich die hier gezeigte

Tendenz eines erhöhten AKI-Risikos bei bekanntem Diabetes mellitus in einer größeren Studie mit signifikanten Ergebnissen untermauern lässt.

Auch weitere Komorbiditäten, u.a. arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz, für die bereits ein Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine Nierenschädigung beschrieben wurde, zeigten hier keinen signifikanten Zusammenhang zur Entstehung einer CSA-AKI. Allerdings zeigte sich für arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz und vorherige kardiochirurgische Eingriffe eine Tendenz zu einem erhöhten Risiko für eine höhergradige AKI. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten, die eine AKI entwickeln, häufig auch Patienten mit arterieller Hypertonie oder Herzinsuffizienz sind [132, 136], weshalb zu vermuten ist, dass bei einer größeren Patientenzahl in dieser Studie die beschriebenen Tendenzen signifikant werden könnten. Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass das ausgewählte Patientenkollektiv (Patienten nach herzchirurgischen Operationen) generell eine erhöhte Prävalenz für diese Vorerkrankungen haben dürfte, da sie Teil des kardiovaskulären Risikoprofils sind, das als Prädiktor für Herzerkrankungen herangezogen wird [137].

Der *Cleveland Clinic Score* und der *STS-Score* werden anhand verschiedener präoperativer Parameter berechnet und können unter anderem Patienten mit erhöhtem Risiko für eine AKI identifizieren [138, 139]. Die erhobenen *Scores* zeigen auch in dieser Studie, dass sie die Entstehung einer AKI Grad 2 oder 3 gut vorhersagen können, da sowohl für den *STS-Score* als auch für den *Cleveland Clinic Score* ein signifikanter Zusammenhang mit der Entstehung einer AKI Grad 2 oder 3 gezeigt wurde. Eine Frage, die sich aus diesen guten Ergebnissen ergibt, ist, warum die beiden *Scores* nicht stärker im klinischen Alltag angewandt werden. Dies könnte zum einen an ihrer Komplexität liegen, beispielsweise kann man zur Berechnung des *STS-Scores* über 60 verschiedene Variablen angeben [140]. Aktuell im klinischen Alltag etablierte *Scores* wie die *Glasgow-Coma-Scale* oder der *SOFA-Score* kommen mit deutlich weniger anzugebenden Werten bzw. Befunden aus [141], was die routinierte Durchführung im Alltag erheblich vereinfacht. Hier kommt der *Cleveland Clinic Score* ins Spiel, da für dessen Berechnung lediglich sieben klinisch etablierte Laborparameter und der Blutentnahmezeitpunkt nötig sind [142]. Die relative Einfachheit dieses *Scores* sollte uns dazu veranlassen, bei kardiochirurgischen Patienten, die postoperativ auf der Intensivstation aufgenommen werden, diesen z. B. im Rahmen routinemäßiger postoperativer Labordiagnostik zu bestimmen, um Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine AKI frühzeitig zu identifizieren. Eine frühzeitige Risikostratifizierung kann dann genutzt werden, um intensiv auf nephroprotektive Maßnahmen wie die Vermeidung von nephrotoxischen Medikamenten,

Kontrastmittel und Hyperglykämien, Optimierung des Volumenstatus und des Perfusionsdrucks, ggf. erweitertes hämodynamisches Monitoring und Kontrollen von Serum-Kreatinin-Konzentration und Urinausscheidung (das sog. „KDIGO-Bundle“) zu achten [1], um so die Entstehung einer AKI möglicherweise zu verhindern.

4.2.4 Volumenhaushalt

Die Niere ist das zentrale Organ für die Regulierung des Volumenhaushalts im Körper und kann bei Ausfall ihrer Funktion erhebliche Folgeschäden verursachen [7]. Weiterhin scheint der Volumenhaushalt eine relevante Rolle bei der Prävention einer AKI zu spielen. Beispielsweise zeigten Vaara et al., dass ein angepasstes, restriktives Flüssigkeitsmanagement mit einer geringeren Inzidenz an dialysepflichtiger AKI einherging und insgesamt der Volumenhaushalt besser durch die Patienten ohne medikamentöse Hilfe reguliert werden konnte [143].

Beim Volumenmanagement scheint in der hier untersuchten Patientengruppe vor allem die postoperative Phase relevant zu sein, da hier eine stärker positive Kristalloidbilanz mit einer AKI Grad 2 oder 3 vergesellschaftet zu sein scheint. Allerdings geht daraus nicht hervor, ob die positivere Kristalloidbilanz eine zu erwartende Folge der geringeren oder verlorenen Ausscheidung ist, oder ob eventuell eine erhöhte Flüssigkeitszufuhr einen Beitrag zur Entstehung einer AKI leistet. Eine weitere mögliche Ursache könnte eine insgesamt höhere Instabilität vor allem des Kreislaufs dieser Patienten sein, die mit Flüssigkeitsgaben aufgefangen werden musste und daher die Flüssigkeitsbilanz beeinflusst hat.

Die Diurese zeigt sich in unserer Studie auch signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Patientengruppen, wobei die postoperative Diurese-Menge signifikant geringer ist, je höher das AKI-Stadium ist. Dies spricht für eine richtige Einordnung in die AKI-Stadien, da dieser Wert eines der Kriterien für die Einteilung der AKI-Stadien nach KDIGO ist [1]. Darüber hinaus ist die Diurese aber auch intraoperativ erniedrigt bei den Patienten mit AKI im Vergleich zu denen ohne AKI, wenngleich dieses Ergebnis keine Signifikanz aufweist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Patienten mit einer schlechten intraoperativen Diurese ein höheres Risiko für die Entstehung einer postoperativen AKI haben. Eine weitere mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass diese Patienten schon intraoperativ eine verringerte Diurese aufweisen, weil die intraoperative Schädigung ausgeprägter ist und eventuell bereits intraoperativ die Nierenfunktion relevant beeinträchtigt wird, die Patienten also susceptibler für eine AKI sind. Im Umkehrschluss kann man möglicherweise folgern, dass zur Prävention

einer AKI auf eine ausreichende Diurese während der Operation geachtet werden sollte, was einen ausreichenden Flüssigkeitshaushalt und gute Bilanzierung voraussetzt.

Für kolloidale Infusionslösungen wie Gelatine oder HAES gab es zu wenig Daten für eine aussagekräftige Schlussfolgerung. Dies ist am ehesten dadurch begründet, dass diese Mittel zum Volumenersatz im heutigen klinischen Alltag eher selten eingesetzt werden, da sie verschiedene Nachteile mit sich bringen wie z. B. ein erhöhtes allergenes Potenzial bei Gelatinehaltigen Lösungen oder das Risiko von Nierenfunktionsschäden bei HAES-Gaben [144-146]. Einige Studien schlussfolgern sogar, dass aufgrund der bekannten negativen Effekte HAES-haltige Infusionslösungen bei Patienten intra- und postoperativ nicht mehr eingesetzt werden sollten. Beispielsweise zeigten Lagny et al. 2016, dass kardiochirurgische Patienten nach HAES-Gaben im Vergleich zu Patienten, die nur kristalloide Infusionslösungen bekamen, ein 2,5-fach erhöhtes Risiko für eine AKI hatten [146].

4.2.5 Laborparameter der Nierenfunktion

Die bisherige Erfassung der Nierenfunktion und Definition der AKI stützt sich in erheblichem Maße auf laborchemisch messbare Parameter, die durch die Nierenfunktion beeinflusst werden wie Serum-Kreatinin, Harnstoff im Serum, Cystatin C, und Kalium im Serum [1]. Gerade weil die bisherigen Laborwerte Einschränkungen durch verschiedene beeinflussende Faktoren unterliegen, wird nach neuen Biomarkern für eine Nierenschädigung gesucht und auch die etablierten Laborwerte werden reevaluiert und hinterfragt [9, 147, 148]. In der MiRAKI-Studie haben wir das Serum-Kreatinin, Cystatin C und Harnstoff im Serum untersucht.

In der Auswertung des Serum-Kreatinins ist ein erhöhter Wert im postoperativen Verlauf signifikant mit der Entstehung einer AKI in Zusammenhang zu bringen, was für eine korrekte Einteilung der Patienten in die jeweiligen Gruppen nach KDIGO spricht. Darüber hinaus ist jedoch auch ein präoperativ erhöhter Serum-Kreatinin-Wert in dieser Studie mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer CSA-AKI in Zusammenhang zu bringen. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in anderen Studien an kardiochirurgischen Patienten, in denen ein erhöhtes präoperatives Serum-Kreatinin oder eine Änderung des Serum-Kreatinins um mehr als 0,4mg/dl mit einer erhöhten Mortalität bzw. Komplikationsrate einhergingen [149, 150].

Daraus ergibt sich die Frage, ob es sinnvoll sein kann, die bei Risikopatienten oder -eingriffen oft durchgeführte präoperative Untersuchung des Kreatinin-Wertes im Serum zu nutzen, um

so Hochrisiko-Patienten schon vor der Operation zu identifizieren und mittels präventiver Maßnahmen wie des „KDIGO-Bundle“ (Vermeidung von nephrotoxischen Medikamenten, Kontrastmittel und Hyperglykämien, Optimierung des Volumenstatus und des Perfusionsdrucks, ggf. erweitertes hämodynamisches Monitoring und Kontrollen von Serum-Kreatinin-Konzentration und Urinausscheidung) die Entstehung einer AKI zu verhindern. Meersch et al. konnten in einer Interventionsstudie mit 276 Patienten zeigen, dass eine konsequente Durchführung dieser Maßnahmen bei Patienten, die mittels Messung von TIMP-2 und IGFBP7 im Urin als Hochrisikopatienten identifiziert wurden, die Häufigkeit und Schwere einer AKI signifikant reduziert wurde, allerdings ohne Einfluss auf die Mortalität. Als Alternative könnte man beispielsweise das präoperative Serum-Kreatinin und den *Cleveland Clinic Score* anwenden (vgl. 4.2.3), um so kostengünstig Risikopatienten zu identifizieren und präventive Maßnahmen konsequent umzusetzen. Dies könnte man in einer nachfolgenden Studie erproben und eruieren, ob eine Änderung der Morbidität oder Mortalität beobachtet werden kann. Da die Bestimmung des Serum-Kreatinins eine gut etablierte, weit verbreitete und kostengünstige Methode ist, ließe sich dadurch ggf. ein gutes Tool zur präoperativen Risikostratifizierung und angepassten Therapieplanung entwickeln.

Allerdings zeigt sich auch beim Cystatin C ein gleichermaßen relevanter und signifikanter Zusammenhang zur Entwicklung einer AKI, was dessen Wert als wichtigen Nierenlaborparameter verifiziert. Da Cystatin C weniger beeinflussenden Faktoren als Kreatinin ausgesetzt ist, ist vor allem bei Patienten, bei denen der Verdacht auf unzuverlässige Serum-Kreatinin-Werte besteht, sein zusätzlicher Einsatz zur Evaluation der Nierenfunktion sinnvoll [151]. Leider gab es in dieser Studie nicht genug Daten für eine Evaluation von Cystatin C als prädiktiven (also präoperativen) Marker. In früheren Studien gab es Hinweise, dass ein präoperativ erhöhtes Cystatin C ein höheres Risiko für eine AKI angeben kann [152], allerdings gibt es ebenfalls Studien, die dies nur eingeschränkt, z. B. durch Verwendung des präoperativen Cystatin C als Referenz für postoperative Werte, oder gar nicht bestätigen konnten [153-155]. Gu et al. konnten eine Korrelation eines präoperativ erhöhten Cystatin C mit einer verschlechterten Nierenfunktion nach Kontrastmittelgabe bei Patienten nach perkutanen Koronarinterventionen feststellen [156], weshalb weitere Forschung zu diesem Thema weiteres Potenzial haben könnte.

Bei der Untersuchung des Urins lässt sich beobachten, dass Patienten mit einer Albuminurie zum Zeitpunkt t_0 signifikant häufiger eine AKI Grad 2 oder 3 entwickelten. Ursachen für eine Albuminurie können zum einen hauptsächlich eine Schädigung der Glomeruli in der Niere sein, wodurch mehr Proteine in den Primärharn gelangen [157], und zum anderen Schäden an den Nierentubuli, wodurch die Rückresorption der filtrierten Proteine reduziert wird [158]. Auch ist bekannt, dass eine renale Ischämie unter anderem durch Apoptose von Podozyten in den Glomeruli und Änderungen an der von ihnen abgedeckten Kapillarfläche zur Albuminurie führen kann [159, 160]. Stehouwer et al. zeigten 2006 in einer Übersichtsarbeit, dass eine bekannte Albuminurie mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht [161] und in einer Studie mit 11.200 Patienten als unabhängiger Risikofaktor für eine AKI identifiziert wurde [162]. Da das Patientenkollektiv der MiRAKI-Studie aus Patienten mit einem bereits hohen kardiovaskulären Risiko und einem realistischen Risiko für eine renale Ischämie besteht, könnte die Messung des Albumins im Urin also durchaus einen prädiktiven Wert besitzen.

Daraus kann man schlussfolgern, dass eine Protein- bzw. Albuminurie zum Zeitpunkt t_0 , also der postoperativen Aufnahme auf der Intensivstation, als prädiktiver Marker für die Entstehung einer AKI dienen kann. Dies könnte klinisch zur Identifizierung von Risikopatienten genutzt werden, indem man beispielsweise bereits präoperativ Patienten auf eine Albuminurie untersucht und in entsprechende Risikogruppen einteilt. Auch in anderen Studien wurde die Albuminurie bereits als Marker für eine schlechtere Nierenfunktion identifiziert [163, 164].

Der gemessene Serumharnstoff unterschied sich nur an den postoperativen Zeitpunkten signifikant zwischen den Patientengruppen ohne und mit AKI, die potenzielle prädiktive Interpretation wie beim Serumkreatinin (s. o.) lässt sich hier also nicht bestätigen.

Serumharnstoff ist ein häufig genutzter, aber unspezifischer Marker für die Nierenfunktion. Er ist unter anderem abhängig von Ernährungsgewohnheiten, der individuellen Proteinsynthese des Patienten oder dem Volumenhaushalt, und sollte nur in Zusammenschau mit anderen Laborparametern interpretiert werden [165]. Trotzdem sollte der Serumharnstoff nicht als nicht aussagekräftig abgetan werden. So zeigten Arihan et al. in einer über 4000 Patienten umfassenden, retrospektiven Studie, dass ein erhöhter Serumharnstoff bei Aufnahme ein unabhängiger Prädiktor für erhöhte Mortalität bei Patienten auf der Intensivstation war [166]. Auch in der aktuellen KDIGO-Leitlinie wird die Messung des Serumharnstoffs vor allem im Hinblick auf die Indikation zur Dialyse empfohlen, auch wenn er nicht Teil der Definition einer AKI ist [1].

Deshalb sollte im postoperativen Setting bei kardiochirurgischen Patienten eine Harnstoff-Bestimmung im Serum erfolgen, da sie breit verfügbar und relativ kostengünstig ist und möglicherweise im Zusammenspiel mit anderen Parametern Risikopatienten für eine CSA-AKI früh postoperativ identifizieren kann bzw. als Warnhinweis dienen kann. Einen Hinweis dafür zeigten beispielsweise 2022 He et al., die mit der Rate aus Harnstoff und Albumin im Serum Patienten mit einer AKI auf der Intensivstation frühzeitig identifizieren konnten [167].

Die im Ergebnisteil beschriebene Signifikanz beim Einsatz von Nierenersatzverfahren ergibt sich gleichfalls wie oben beim Serum-Kreatinin und der Diurese beschrieben aus der KDIGO-Einteilung zu den AKI-Stadien und ist dementsprechend zu erwarten gewesen. Jeder Patient mit einem Nierenersatzverfahren wird nach KDIGO-Kriterien der Gruppe AKI 3 zugeordnet [1]. Demnach ist es klar, dass kein Patient ohne AKI oder mit AKI Grad 1 ein Nierenersatzverfahren benötigte (vgl. 3.4.5.2).

4.2.6 Transfusion

Bluttransfusionen sind bei kardiochirurgischen Operationen und auf der Intensivstation häufig und lassen sich oft zur Stabilisierung der Patienten nicht umgehen. Allerdings gibt es Hinweise, dass Transfusionen, vor allem von großen Mengen an Blutprodukten oder von Erythrozytenkonzentraten mit einer längeren Lagerungsdauer, bei gefährdeten Patienten zu einer Organschädigung beitragen können.

Mit Blick auf die Analyse der durchgeführten Transfusionen im Rahmen der intra- und postoperativen Therapie bei den Patienten in dieser Studie zeigt sich, dass die Gabe von Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmen vermehrt mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung vor allem einer AKI Grad 2 oder 3 vergesellschaftet ist. Auch bei der intraoperativen Gabe von Thrombozytenkonzentraten zeigt sich, dass Patienten, die intraoperativ Thrombozytenkonzentrate bekamen, signifikant häufiger eine AKI entwickelten als Patienten ohne transfundierte Thrombozytenkonzentrate.

In vielen Studien zum Zusammenhang zwischen Transfusionen und AKI wird das Alter der genutzten Blutprodukte als ursächlich angesehen, z. B. durch Zellzerfall mit Freisetzung von freiem Hämoglobin und Eisen, Anhäufung proinflammatorischer Mediatoren [168] und Änderungen der Erythrozyten-Struktur selbst mit geringerer Verformbarkeit [169]. In einer 6002 kardiochirurgische Patienten umfassenden Studie von Koch et al. waren unter anderem die Mortalität und auch das Auftreten eines Nierenversagens, also einer CSA-AKI, signifikant

häufiger bei Patienten, die Erythrozytenkonzentrate erhielten, die länger als 14 Tage gelagert wurden. Dies kommt wahrscheinlich durch lagerungsbedingte Veränderungen der Blutprodukte zustande [170]. Allerdings wurde in der MiRAKI-Studie die Lagerungsdauer der transfundierten Blutprodukte nicht dokumentiert bzw. untersucht, weswegen ein direkter Vergleich mit der oben genannten Studie von Koch et al. nur eingeschränkt möglich ist. Eine weitere Studie zum Einfluss von Erythrozytenkonzentraten auf die Entstehung einer CSA-AKI identifizierte *myeloid-related protein 14* als möglichen Faktor für eine Nierenschädigung durch Transfusionen [171]. Auch wenn die Studie nur Proteine untersuchte, die durch kommerziell erhältliche Tests quantifiziert werden konnten, weist sie auf die Vielzahl an noch nicht bekannten Zusammenhängen zwischen Transfusionen und CSA-AKI hin [171, 172]. Häufig wird nur die Gabe von Erythrozytenkonzentraten im Zusammenhang mit postoperativer AKI betrachtet [170-173]. Kindzelski et al. zeigten allerdings auch für gefrorene Frischplasmen und Thrombozytenkonzentrate einen signifikanten Zusammenhang zwischen vermehrter Transfusion und der Entwicklung einer AKI [174].

Insgesamt wäre also auch für die MiRAKI-Studie zu erwarten, dass ein insgesamt erhöhter Transfusionsbedarf mit einem erhöhten Risiko für eine AKI einhergeht, was sich in den erhobenen Daten bestätigt. Zu beachten ist allerdings, dass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob der erhöhte Transfusionsbedarf der Auslöser für die Organschädigung ist. Er kann auch nur ein Ausdruck einer höheren intra- und perioperativen Instabilität einiger Patienten sein, die ein ohnehin höheres Risiko für Organschäden bzw. AKI haben, unabhängig von der am Ende tatsächlich durchgeführten Anzahl an Transfusionen. So zeigte sich in einer 2019 von Garg et al. durchgeführten randomisierten kontrollierten Pilotstudie kein Unterschied bezüglich der Entwicklung einer AKI zwischen einer restriktiv transfundierten Kohorte, die ab einem Plasma-Hämoglobingehalt $<7,5$ g/dl transfundiert wurden, und einer großzügig transfundierten Kohorte, die ab einem Plasma-Hämoglobingehalt $<9,5$ g/dl intraoperativ bzw. $<8,5$ g/dl auf der Intensivstation transfundiert wurden [175]. Also zeigte sich bei der restriktiv transfundierten Kohorte kein schlechteres *Outcome* bzgl. einer AKI, bei aber insgesamt deutlich weniger transfundierten Blutprodukten, was andere Komplikationen wie Transfusionsreaktionen, transfusionsassoziierte Lungenschädigungen oder Infektionen vermeiden kann und zusätzlich Kosten spart. Anhand dieser Ergebnisse sollten Transfusionen also eher zurückhaltend und nur bei adäquater Indikation durchgeführt werden, vor allem bei Patienten nach kardiochirurgischen Operationen, die zusätzlich ein erhöhtes Risiko für eine AKI haben.

Es bleibt insgesamt offen, ob Transfusionen Ursache oder nur Begleiterscheinung eines erhöhten Risikos für eine schwere AKI sind, vor allem aufgrund der multifaktoriellen Genese einer AKI, die nicht allein vom Transfusionsregime abhängt [176]. Aufgrund dieser Unsicherheiten und den im kardiochirurgischen Setting verschiedenen guten Gründen für Bluttransfusionen, hat die *Society of Cardiovascular Anesthesiologists* bisher keine Empfehlung für restriktive Bluttransfusionen aus rein nephroprotektiven Gründen ausgesprochen [177].

4.2.7 Hämodynamik und kreislaufwirksame Medikamente

Katecholamine und inotrope Medikamente sind in der Versorgung von kritisch Kranken und herzchirurgischen Patienten zur Kreislaufstabilisierung unabdingbar und werden regelhaft im operativen und intensivmedizinischen Setting eingesetzt [178]. Trotzdem bergen auch sie das Potenzial von unerwünschten Effekten, die z. B. eine AKI begünstigen können, wenngleich die Datenlage nicht immer eindeutig ist [179, 180]. Die Relevanz eines stabilen Kreislaufs mit einem ausreichenden Perfusionsdruck zeigten u. a. Vandenberghe et al. 2022 in ihrer Studie. Sie zeigten, dass die Dosierungen an Katecholaminen keinen Einfluss auf die Entwicklung einer CSA-AKI hatten, sondern der mittlere Perfusionsdruck (*mean perfusion pressure*, MPP). Darüber hinaus war in ihrer Studie nicht nur die Entstehung einer CSA-AKI mit einem erniedrigten MPP vergesellschaftet, sondern auch die Erholung von einer CSA-AKI mit einem verbesserten MPP [181].

Bei der Analyse der gegebenen kreislaufwirksamen Medikamente zeigen sich in dieser Studie Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für eine AKI im Zusammenhang mit höheren Katecholamindosierungen. So hatten die Patienten, die postoperativ eine AKI entwickelten im Schnitt signifikant höhere Mengen an Katecholaminen im postoperativen Verlauf erhalten. Dies kann für Noradrenalin und Adrenalin bei allen Patienten mit einer AKI auch im post-Test bestätigt werden, wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass nur 31 Patienten in der Studienkohorte Adrenalin im Beobachtungszeitraum erhielten. Daraus ließe sich der Schluss ziehen, dass Noradrenalin und Adrenalin relevante Risikofaktoren für eine AKI sind. Da allerdings kaum ein Patient im kardiochirurgischen Setting ohne eine Katecholamintherapie auskommt, wäre dieser Schluss klinisch kaum relevant, weil ein Verzicht auf eine Katecholamintherapie aktuell nicht realistisch umsetzbar ist. Andererseits lässt sich auch vermuten, dass wie bei der Analyse der durchgeführten Transfusionen bereits genannt (s. 4.2.6) hier nicht unbedingt eine Kausalkette vorliegen muss, sondern die höheren Katecholamindosierungen nur eine Begleiterscheinung bei Patienten mit größerer

Krankheitslast oder Instabilität sind. Diese Patienten könnten aufgrund anderer Probleme ein erhöhtes AKI-Risiko haben und die Katecholamindosierungen unabhängig vom AKI-Risiko erhöht sein. Es lässt sich ähnlich wie oben erwähnt also nicht abschließend sagen, ob die Katecholamine Ursache oder nur Begleiterscheinung bei einem erhöhten AKI-Risiko sind [181]. Bei der Gabe von Dobutamin fällt auf, dass auch hier höhere Gaben im Zeitraum 25 bis 72h postoperativ mit einem erhöhten Risiko für eine AKI einhergehen, allerdings nur für AKI Grad 2 und 3. Damit stellt sich die Frage, ob Dobutamin als Inotropikum im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine AKI Grad 1 gegenüber Adrenalin im Vorteil ist, da bei Dobutamin scheinbar das Risiko niedriger ist. Im Umkehrschluss könnte man folgern, dass Patienten, die mit Dobutamin eine schwere AKI entwickeln unabhängig vom gewählten Inotropikum eine AKI entwickeln würden. Aufgrund der teils unterschiedlichen Wirkungen auf Kreislauf und Gefäße ist eine definitive Schlussfolgerung allerdings nur eingeschränkt möglich.

Die Gabe von Milrinon ist hier trotz teilweise statistisch signifikanter Ergebnisse nur bedingt verwertbar, da nur für Patienten mit AKI 1 intraoperativ und Patienten mit AKI 2 oder 3 25-48h postoperativ ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Milrinondosis und der Entstehung einer AKI besteht.

Die statistische Auswertung der Herzfrequenz zeigt keinen signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung einer AKI. Dies kann unter anderem daran liegen, dass intra- und perioperativ viele verschiedene Faktoren wie Volumenhaushalt oder Medikamentengaben die Herzfrequenz beeinflussen, wodurch keine klare Aussage über einen etwaigen Zusammenhang getroffen werden kann. Auch bei der Auswertung des mittleren arteriellen Blutdrucks gab es keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zur Entstehung einer AKI. Dies ist in dem Sinne interessant, als dass ein niedriger Blutdruck mit einem erhöhten Risiko für Endorganschäden wie z. B. einer AKI assoziiert wird. So zeigten z. B. Walsh et al. 2013, dass auch eine kurze Zeit mit einem MAD <55 mmHg intraoperativ mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine postoperative AKI einherging [182]. In der MiRAKI-Studie gab es jedoch im Durchschnitt für alle untersuchten Patientengruppen keinen Abfall des MAD unter 55 mmHg, was suggeriert, dass die klinisch häufig genutzte Grenze eines MAD > 60 mmHg zur Organprotektion gut gewählt ist.

4.2.8 Herzenzyme

In dieser Studie wurden die Creatinkinase (CK), die Creatinkinase *Muscle-Brain-type* (CK-MB) und das Troponin auf einen Zusammenhang zur Entwicklung einer AKI untersucht.

Eine erhöhte CK kann unter anderem ein laborchemisches Zeichen für den Zerfall von Skelettmuskel-Zellen sein [183]. Die Ursachen können dabei vielfältig sein, beispielsweise eine Nebenwirkung von Medikamenten, Folgen eines direkten Muskel-Traumas oder Minderdurchblutung durch Gefäßveränderungen oder Kreislaufinsuffizienz. Beim Zerfall der Skelettmuskelzellen kommt es durch Ödembildung im geschädigten Gewebe zu einer Volumenverschiebung nach extravasal, außerdem werden unter anderem nephrotoxische Stoffe wie Myoglobin und vasoaktive Substanzen freigesetzt, die die Durchblutung der Nieren und auch die Nierenfunktion direkt einschränken [184]. Diese Mechanismen können eine AKI hervorrufen, je nach Quelle geht man von einer Inzidenz einer AKI bei Rhabdomyolyse (eines massiven Untergangs von Muskelzellen in kurzer Zeit) von 5-30% aus [184, 185]. Die CK könnte also indirekt als Marker für ein erhöhtes AKI-Risiko betrachtet werden, wobei die Datenlage zu dieser Annahme in verschiedenen Studien unterschiedlich ist. Erst bei hohen CK-Spiegeln im Plasma (>5000 U/l) gibt es einen Zusammenhang mit einem höheren Risiko für AKI [186], wobei die meisten Studien sich eher auf eine AKI durch Rhabdomyolyse beschränken und nicht auf eine CSA-AKI [187, 188] und bei einer AKI durch Rhabdomyolyse viele weitere Faktoren neben dem CK-Spiegel eine Rolle spielen [189]. In dieser Studie fällt auf, dass die Creatinkinase zu den Zeitpunkten t_{48} und t_{72} in der Patientengruppe mit AKI 2 oder 3 die höchsten Werte erreicht, zum Zeitpunkt t_{72} sogar mit statistischer Signifikanz. Hier ist es also plausibel, dass eine erhöhte CK im Serum auch im postoperativen Setting ein Hinweis für ein erhöhtes Risiko für eine höhergradige AKI sein kann. Eine mögliche Erklärung für die postoperativ erhöhten CK-Werte können das direkte OP-Trauma, Lagerungsschäden jeder Art oder die Minderdurchblutung von Muskelgewebe z. B. durch unzureichende Kreislaufverhältnisse sein. Ein kausaler Zusammenhang zur Entstehung einer AKI wäre theoretisch denkbar, wird aber von der aktuellen Forschungslage eher nicht unterstützt, da scheinbar die Nephrotoxizität des freigesetzten Myoglobins gemeinsam mit entzündlichen Prozessen und renaler Vasokonstriktion im Vordergrund steht [190, 191]. Außerdem zeigte eine Studie von Clarkson et al., dass beispielsweise nach sportlicher Anstrengung die CK auch auf Werte steigen kann, die für die Diagnose einer Rhabdomyolyse reichen, ohne dass eine AKI eintritt [192], was die multifaktorielle Genese der AKI bei starkem Muskelzellerfall weiter unterstreicht.

Die Creatinkinase *Muscle-Brain-type* (CK-MB) weist die oben beschriebene Eigenheit in dieser Studie nicht auf, hat also scheinbar keine Relevanz für die Entstehung einer AKI. Die CK-MB ist ein etablierter Marker für eine Schädigung von Herzmuskelzellen und korreliert z. B. auch mit der Narbengröße und eventuellen Wandbewegungsstörungen am Herzen [193]. Eine mögliche

Theorie wäre, dass eine starke Erhöhung der gemessenen CK durch z. B. eine Herzinsuffizienz sekundär auch andere Organschäden im Sinne eines kardiorenenalen Syndroms begünstigen könnte [194]. Allerdings zeigt sich dafür in dieser Studie, die ebendiese Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiale Probleme wie einer akuten Herzinsuffizienz beobachtet, hinsichtlich der gemessenen CK kein echter Hinweis darauf.

Aber ein weiterer interessanter Zusammenhang, der sich in der Analyse der kardialen Laborparameter zeigt, ist, dass Patienten, die im postoperativen Verlauf eine AKI Grad 2 oder 3 entwickelten, im Durchschnitt signifikant höhere Troponin-Werte aufweisen als die Patienten mit AKI 1 und ohne AKI. Hierbei stellt sich ebenfalls die Frage, ob das häufigere Auftreten einer höhergradigen AKI durch das Troponin selbst bedingt ist, oder ob es wahrscheinlicher ist, dass es, wie oben beschrieben, einen sekundärer Endorganschaden durch einen größeren kardialen Schaden darstellt. Im Falle des Patientenkollektivs der MiRAKI-Studie wäre am ehesten ein kardiorenales Syndrom Typ 1, bei dem eine AKI aufgrund einer akut einsetzenden Verschlechterung der kardialen Leistung auftritt, denkbar. Wäre dies der Fall, würden sich auch negative Auswirkungen auf die Mortalität der Patienten vermuten lassen, die in einer Meta-Analyse von Vandenberghe et al. vor allem bei Patienten mit kardiorenalem Syndrom nach kardiochirurgischen Operationen im Vergleich zu anderen kardialen Ursachen erhöht war [195]. Hier wäre also zumindest anteilig ein Zusammenhang der erhöhten Troponin-Werte und einer AKI im Sinne eines kardiorenenalen Syndroms Typ 1 plausibel.

Eine weitere theoretische Erklärung wäre, dass die systemische Eliminierung des Troponins durch eine höhergradige AKI so reduziert wird, dass es akkumuliert und so die beschriebene signifikante Erhöhung zustande kommt. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich, da in mehreren Studien bereits gezeigt wurde, dass eine eingeschränkte Nierenfunktion mit niedriger GFR keinen relevanten Einfluss auf die Troponin-Spiegel im Serum hat [196-198]. Darüber hinaus haben die Patienten, die postoperativ eine höhergradige AKI entwickelten, aber auch bereits präoperativ signifikant höhere Troponin-Werte als die anderen beiden Patientengruppen. Die Ursache muss hier wie gerade beschrieben nicht unbedingt eine Kausalkette sein, allerdings könnte die präoperative Messung des Troponins in Zukunft eine ergänzende Möglichkeit zur präoperativen Identifizierung von Risikopatienten für eine höhergradige AKI bieten. Diese Möglichkeit des Troponins als Tool zur Risikoabschätzung und Früherkennung einer AKI wurde z. B. im Kombination mit NGAL erforscht, wenngleich die diagnostische Aussagekraft nur unter Vorbehalt gegeben war [199].

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zur Beantwortung der Fragestellung dieser Dissertationsarbeit haben wir die miRNAs miR-1, miR-21 und miR-29c im Plasma von kardiochirurgischen Patienten mit und ohne AKI gemessen und auf unterschiedliche Expression untersucht. Dabei zeigte sich am ersten postoperativen Tag eine signifikant erhöhte Expression der miR-21 bei den Patienten mit AKI 2 oder 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne AKI. Bei den miRNAs miR-1 und miR-29c zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikant veränderte Expression zwischen den Patientengruppen mit und ohne AKI. Die Risikoeinschätzung für eine AKI mittels TIMP-2 * IGFBP7 konnte Patienten mit erhöhtem AKI-Risiko ebenso wie der *STS-Score* und der *Cleveland Clinic Score* gut identifizieren. Obwohl die Patientencharakteristika und Komorbiditäten keine relevanten Faktoren für eine AKI in dieser Studie waren, konnten verschiedene klinische und laborchemische Parameter wie erhöhtes präoperatives Troponin, stärker positive postoperative Kristalloidbilanz oder die Gabe von Blutprodukten im Zusammenhang mit dem Auftreten einer CSA-AKI aufgezeigt werden.

Das Potenzial von miRNAs als diagnostische Marker ist ein aktuell stark expandierendes Forschungsgebiet. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Rolle von miRNAs bei der Entstehung einer AKI nach kardiochirurgischen Operationen vor allem in der frühen Schädigungsphase vorhanden ist. Dabei könnte es ein Ziel sein, mit einer Nierenschädigung assoziierte miRNAs zu identifizieren und z. B. präoperativ oder früh postoperativ Patienten zu screenen, um solche mit erhöhtem Risiko für eine AKI zu identifizieren. Aufgrund der bisher aber noch sehr zeit- und kostenintensiven diagnostischen Methoden zur Messung und Identifikation von miRNAs ist bis dahin noch eine ausgeprägte Weiterentwicklung der Methoden vonnöten, um beispielsweise das Ziel eines Bedside-Tests für miRNAs zu erreichen. Da aber auch mit solchen diagnostischen Möglichkeiten die Therapie der AKI bei dem aktuellen Stand der Forschung allenfalls symptomatisch erfolgen kann, wäre der nächste Blick in die Zukunft dann eine Suche nach miRNA-Agonisten/-Antagonisten, welche die für eine AKI verantwortlichen Signalwege modifizieren würden, um so der Entstehung einer AKI vorzubeugen oder den Erholungsprozess der Niere nach AKI zu beschleunigen. Erste Studien an Tiermodellen und klinische Studien am Menschen lieferten schon ermutigende Hinweise, dass der therapeutische Nutzen von miRNAs in der absehbaren Zukunft eine Realität werden könnte. Aber es gibt bis dahin einige Hürden zu bewältigen. Dazu zählen neben der Identifikation der spezifischen miRNAs bzw. miRNA-*Targets* auch praktische Dinge wie

Dosisfindung, unklare und potenziell breite Nebenwirkungsprofile, Transport an den Wirkort und adäquate Wirkdauer [200].

Im expliziten Bezug auf diese Studie könnte vor allem eine weitere Erforschung der miR-21 im unmittelbar postoperativen Zeitfenster mit einer größeren Studiengruppe Sinn machen.

Auch eine Folgestudie zur Evaluation von miRNAs im Urin von Patienten mit AKI könnte aufgrund des für die Niere spezifischeren Untersuchungsmaterials zur weiteren Evaluation von miRNAs als Biomarker beitragen. Beispielsweise konnten Newbury et al. 2021 unter anderem erhöhte Konzentrationen der miR-21 im Urin von Patienten mit AKI nachweisen [201]. Gerade bei einer höhergradigen AKI mit Anurie kann die Gewinnung von Urinproben allerdings enorm erschwert bis unmöglich sein, weswegen eine Analyse des Blutes eine sichere Alternative darstellt.

Darüber hinaus ergibt sich aus den vorliegenden Daten auch das Potenzial für einen Risiko-Score, der in etwa aus bekannten Risikofaktoren wie Alter, Diabetes und Herzinsuffizienz bestehen könnte, aber auch bisher im Zusammenhang mit einer AKI seltener betrachtete Parameter wie präoperatives Kreatinin oder Troponin im Serum sowie Transfusions- und Katecholaminbedarf einbeziehen könnte. Eine solche Entwicklung könnte Bestandteil weiterer Studien sein.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. KDIGO, *KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury*. Kidney International, 2012. **2**(1): p. 19-36.
2. Hoste, E.A.J., et al., *Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury*. Nature Reviews Nephrology, 2018. **14**(10): p. 607-625.
3. Brandenburger, T., et al., *Noncoding RNAs in acute kidney injury*. Kidney International, 2018. **94**(5): p. 870-881.
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 Purification, 2014. **37 Suppl 2**: p. 34-50.
6. Ostermann, M., et al., *Cardiac Surgery Associated AKI Prevention Strategies and Medical Treatment for CSA-AKI*. J Clin Med, 2021. **10**(22).
7. Odutayo, A., et al., *AKI and Long-Term Risk for Cardiovascular Events and Mortality*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(1): p. 377-387.
8. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
9. 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.
10. Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk, *Creatine and Creatinine Metabolism*, P. Review, Editor. 2000.
11. 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.
12. Cockcroft, D. and M. Gault, *Cockcroft DW, Gault MHPrediction of creatine clearance from serum creatinine. Nephron 16: 31-41*. Nephron, 1976. **16**: p. 31-41.
13. Fesler, P. and A. Mimran, *Estimation of glomerular filtration rate: what are the pitfalls?* Curr Hypertens Rep, 2011. **13**(2): p. 116-21.
14. Goldstein, S.L., et al., *Renal recovery*. Crit Care, 2014. **18**(1): p. 301.
15. 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.
16. Guder, W.G., *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. 2019: Publisher NameSpringer, Berlin, Heidelberg.
17. Piper, W., *Innere Medizin*. 2007, Heidelberg: Springer.

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. 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.
20. Schrezenmeier, E.V., et al., *Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance*. Acta Physiologica (Oxf), 2017. **219**(3): p. 554-572.
21. 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.
22. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. The Lancet, 2005. **365**(9466): p. 1231-1238.
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. Khorashadi, M., et al., *Proenkephalin: A New Biomarker for Glomerular Filtration Rate and Acute Kidney Injury*. Nephron, 2020. **144**(12): p. 655-661.
26. Beunders, R., et al., *Proenkephalin (PENK) as a Novel Biomarker for Kidney Function*. J Appl Lab Med, 2017. **2**(3): p. 400-412.
27. Denning, G.M., et al., *Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues*. Peptides, 2008. **29**(1): p. 83-92.
28. Shah, K.S., et al., *Proenkephalin predicts acute kidney injury in cardiac surgery patients*. Clin Nephrol, 2015. **83**(1): p. 29-35.
29. Cardenas-Gonzalez, M., M. Pavkovic, and V.S. Vaidya, *Biomarkers of Acute Kidney Injury, in Comprehensive Toxicology*. 2018. p. 147-163.
30. Kashani, K., et al., *Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury*. Critical Care, 2013. **17**(1): p. R25.
31. Bihorac, A., et al., *Validation of cell-cycle arrest biomarkers for acute kidney injury using clinical adjudication*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(8): p. 932-9.
32. Astute Medical. *Nephrocheck - FAQs: What are the Sensitivity and Specificity of the NephroCheck® Test?* o. J. 21.12.2020]; Available from: <https://www.nephrocheck.com/faqs/>.
33. Bell, M., et al., *Assessment of cell-cycle arrest biomarkers to predict early and delayed acute kidney injury*. Dis Markers, 2015. **2015**: p. 158658.

34. Hoste, E., et al., *Identification and validation of biomarkers of persistent acute kidney injury: the RUBY study*. Intensive Care Med, 2020. **46**(5): p. 943-953.
35. Prowle, J.R., et al., *Serial Urinary C-C Motif Chemokine Ligand 14 and Risk of Persistent Severe Acute Kidney Injury*. Crit Care Explor, 2023. **5**(3): p. e0870.
36. Bagshaw, S.M., et al., *External validation of urinary C-C motif chemokine ligand 14 (CCL14) for prediction of persistent acute kidney injury*. Crit Care, 2021. **25**(1): p. 185.
37. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
38. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1540.
39. miRBase. *miRBase - Homo sapiens miRNAs*. o. J. 31.12.2020]; Available from: <http://mirbase.org/summary.shtml?org=hsa>.
40. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
41. Ambros, V., *The evolution of our thinking about microRNAs*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1036-40.
42. 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.
43. Chen, J.F., et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 228-33.
44. 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.
45. Janssen, H.L.A., et al., *Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(18): p. 1685-1694.
46. Smith, E.S., et al., *Clinical Applications of Short Non-Coding RNA-Based Therapies in the Era of Precision Medicine*. Cancers (Basel), 2022. **14**(6).
47. Foinquinos, A., et al., *Preclinical development of a miR-132 inhibitor for heart failure treatment*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 633.
48. Batkai, S., et al., *CDR132L improves systolic and diastolic function in a large animal model of chronic heart failure*. Eur Heart J, 2021. **42**(2): p. 192-201.
49. Täubel, J., et al., *Novel antisense therapy targeting microRNA-132 in patients with heart failure: results of a first-in-human Phase 1b randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Eur Heart J, 2021. **42**(2): p. 178-188.
50. U.S. National Library of Medicine. *Study to Assess Efficacy and Safety of CDR132L in Patients With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction After Myocardial Infarction*

(HF-REVERT). 2022 February 28, 2023 [cited 2023 28.05.2023]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05350969>.

51. Huang, H., et al., *Expression of microRNA-10a, microRNA-342-3p and their predicted target gene TIAM1 in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type*. *Oncol Lett*, 2016. **11**(1): p. 345-351.
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. 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.
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. Wilflingseder, J., et al., *miR-182-5p Inhibition Ameliorates Ischemic Acute Kidney Injury*. *Am J Pathol*, 2017. **187**(1): p. 70-79.
57. Aomatsu, A., et al., *MicroRNA expression profiling in acute kidney injury*. *Transl Res*, 2022. **244**: p. 1-31.
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. Neal, C.S., et al., *Circulating microRNA expression is reduced in chronic kidney disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(11): p. 3794-802.
60. 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.
61. 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.
62. Liu, Z., et al., *Discovery and validation of miR-452 as an effective biomarker for acute kidney injury in sepsis*. *Theranostics*, 2020. **10**(26): p. 11963-11975.
63. 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.
64. Kiers, H.D., et al., *Comparison and clinical suitability of eight prediction models for cardiac surgery-related acute kidney injury*. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. **28**(2): p. 345-51.
65. 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.

66. 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.
67. Oshlack, A., M.D. Robinson, and M.D. Young, *From RNA-seq reads to differential expression results*. Genome Biology, 2010. **11**(12): p. 220.
68. Knippers, R., *Expressionsanalytik durch RNA-Seq*, in *Molekulare Genetik*, A. Nordheim and R. Knippers, Editors. 2018, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 498-499.
69. 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.
70. 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.
71. Baxevanis, A.D., G.D. Bader, and D.S. Wishart, *Bioinformatics*. 2020: Wiley.
72. 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.
73. Tian, L., et al., *MiR-361-5p suppresses chemoresistance of gastric cancer cells by targeting FOXM1 via the PI3K/Akt/mTOR pathway*. Oncotarget, 2018. **9**(4): p. 4886-4896.
74. Nowrousian, M., *PCR-Analytik*, in *Praktikum der Molekulargenetik*, U. Kück, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 221-245.
75. Promega. *What is Real-Time qPCR?* o. J. 20.12.2020]; Available from: <https://www.promega.de/products/pcr/qpcr-and-rt-qpcr/#related-resources>.
76. 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.
77. *miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Handbook*. 2017, QIAGEN.
78. Castoldi, M., *Rules for primer design for miQPCR (v2.0)*. 2018: personal guide.
79. *Melting Temperature*, in *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 2008, Springer Netherlands. p. 1178-1178.
80. Astute Medical. *Astute140 Meter Benutzerhandbuch*. 2014 21.12.2020]; Available from: <https://www.nephrocheck.com/documents/Astute140%20User%20Manual%20EU%20IVD%20German%20PN-300005DE.pdf>.
81. *MicroRNA/small RNA NGS Data Analysis Report*. 2018, EXIQON.
82. Larrue, R., et al., *The Versatile Role of miR-21 in Renal Homeostasis and Diseases*. Cells, 2022. **11**(21).

83. Ruiz, S., et al., *Screening of patients with augmented renal clearance in ICU: taking into account the CKD-EPI equation, the age, and the cause of admission*. *Ann Intensive Care*, 2015. **5**(1): p. 49.
84. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(9): p. 604-12.
85. Bragadottir, G., B. Redfors, and S.-E. Ricksten, *Assessing glomerular filtration rate (GFR) in critically ill patients with acute kidney injury - true GFR versus urinary creatinine clearance and estimating equations*. *Critical Care*, 2013. **17**(3): p. R108.
86. Hosmer, D.W., Jr., Lemeshow, S. and Sturdivant, R.X., *Assessing the Fit of the Model*, in *Applied Logistic Regression*. 2013. p. 177.
87. Hu, J., et al., *Global Incidence and Outcomes of Adult Patients With Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2016. **30**(1): p. 82-9.
88. Hoste, E.A., et al., *The Epidemiology of Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury*. *The International Journal of Artificial Organs*, 2008. **31**(2): p. 158-165.
89. Reinartz, J., et al., *Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2002. **1**(1): p. 95-104.
90. Sikkema-Raddatz, B., et al., *Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics*. *Hum Mutat*, 2013. **34**(7): p. 1035-42.
91. Beck, T.F., J.C. Mullikin, and L.G. Biesecker, *Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants*. *Clin Chem*, 2016. **62**(4): p. 647-54.
92. Baudhuin, L.M., et al., *Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing*. *J Mol Diagn*, 2015. **17**(4): p. 456-61.
93. Forero, D.A., et al., *qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs*. *BioTechniques*, 2019. **67**(4): p. 192-199.
94. Kim, Y.K., et al., *Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells*. *Mol Cell*, 2012. **46**(6): p. 893-5.
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. 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.
97. Vigneron, N., et al., *Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy*. *Molecular Oncology*, 2016. **10**(7): p. 981-992.

98. McDonald, J.S., et al., *Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges*. *Clinical Chemistry*, 2011. **57**(6): p. 833-840.
99. Binderup, H.G., et al., *Pre-storage centrifugation conditions have significant impact on measured microRNA levels in biobanked EDTA plasma samples*. *Biochem Biophys Rep*, 2016. **7**: p. 195-200.
100. Zhao, Y., et al., *Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2*. *Cell*, 2007. **129**(2): p. 303-317.
101. Safa, A., et al., *miR-1: A comprehensive review of its role in normal development and diverse disorders*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020. **132**: p. 110903.
102. Kawakami, K., et al., *The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(6): p. 827-36.
103. Rigaud, V.O., et al., *Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2017. **8**(4): p. 6994-7002.
104. Zhao, P., et al., *Circulating Exosomal miR-1-3p from Rats with Myocardial Infarction Plays a Protective Effect on Contrast-Induced Nephropathy via Targeting ATG13 and activating the AKT Signaling Pathway*. *Int J Biol Sci*, 2021. **17**(4): p. 972-985.
105. Sygitowicz, G., et al., *Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results*. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 2015. **108**(12): p. 634-642.
106. Bostjancic, E., et al., *MicroRNA miR-1 is up-regulated in remote myocardium in patients with myocardial infarction*. *Folia Biol (Praha)*, 2010. **56**(1): p. 27-31.
107. Ma, Q., et al., *Circulating miR-1 as a potential predictor of left ventricular remodeling following acute ST-segment myocardial infarction using cardiac magnetic resonance*. *Quant Imaging Med Surg*, 2020. **10**(7): p. 1490-1503.
108. Kölling, M., et al., *Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice*. *Mol Ther*, 2017. **25**(1): p. 165-180.
109. Glowacki, F., et al., *Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(2): p. e58014.
110. Hu, H., et al., *MicroRNA-21 Attenuates Renal Ischemia Reperfusion Injury via Targeting Caspase Signaling in Mice*. *American Journal of Nephrology*, 2014. **40**(3): p. 215-223.
111. Sadat-Ebrahimi, S.R., et al., *Novel diagnostic potential of miR-1 in patients with acute heart failure*. *PLoS One*, 2022. **17**(9): p. e0275019.
112. Wu, S.Y., et al., *[Value of serum miR-21-3p in predicting acute kidney injury in children with sepsis]*. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2020. **22**(3): p. 269-273.
113. Kaucsár, T., et al., *Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury*. *Nucleic Acid Ther*, 2013. **23**(5): p. 344-54.

114. Dalgaard, L.T., et al., *The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease*. Am J Physiol Cell Physiol, 2022. **323**(2): p. C367-c377.
115. Cao, Y., et al., *MiR-29c-3p May Promote the Progression of Alzheimer's Disease through BACE1*. J Healthc Eng, 2021. **2021**: p. 2031407.
116. Wang, H., et al., *MiR-29c-3p Suppresses the Migration, Invasion and Cell Cycle in Esophageal Carcinoma via CCNA2/p53 Axis*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 75.
117. Feng, S., et al., *miR-29c-3p regulates proliferation and migration in ovarian cancer by targeting KIF4A*. World J Surg Oncol, 2020. **18**(1): p. 315.
118. Shang, J., et al., *miR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(4): p. 520-32.
119. Oto, J., et al., *Identification of miR-29c-3p as a Robust Normalizer for Urine microRNA Studies in Bladder Cancer*. Biomedicines, 2020. **8**(11).
120. Wang, G., et al., *Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis*. Am J Nephrol, 2012. **36**(5): p. 412-8.
121. Solé, C., et al., *miR-29c in urinary exosomes as predictor of early renal fibrosis in lupus nephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(9): p. 1488-96.
122. Feng, W., et al., *miR-29c Inhibits Renal Interstitial Fibrotic Proliferative Properties through PI3K-AKT Pathway*. Appl Bionics Biomech, 2022. **2022**: p. 6382323.
123. Huang, H., et al., *The MicroRNA MiR-29c Alleviates Renal Fibrosis via TPM1-Mediated Suppression of the Wnt/ β -Catenin Pathway*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 331.
124. Seo, D.W., et al., *Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(6): p. 3711-21.
125. Ko, T., et al., *Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- β -IGFBP7 axis*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 3275.
126. Zhao, Q., et al., *Increased IGFBP7 Expression Correlates with Poor Prognosis and Immune Infiltration in Gastric Cancer*. J Cancer, 2021. **12**(5): p. 1343-1355.
127. Yi, X., et al., *IGFBP7 and the Tumor Immune Landscape: A Novel Target for Immunotherapy in Bladder Cancer*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 898493.
128. Zhang, G., et al., *TIMP-2 regulates 5-Fu resistance via the ERK/MAPK signaling pathway in colorectal cancer*. Aging (Albany NY), 2022. **14**(1): p. 297-315.
129. Ciuca, A.M., L.P. Bolin, and C. Horne, *Perioperative Urinary TIMP-2*IGFBP7 and Acute Kidney Injury: A Systematic Review*. Aana j, 2022. **90**(3): p. 171-179.
130. Couturier, C., et al., *Prevention of cardiac surgery-associated acute kidney injury by risk stratification using (TIMP-2)*(IGFBP7)*. Biomark Med, 2021. **15**(14): p. 1201-1210.

131. Esmeijer, K., et al., *The predictive value of TIMP-2 and IGFBP7 for kidney failure and 30-day mortality after elective cardiac surgery*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 1071.
132. Drawz, P.E., R.T. Miller, and A.R. Sehgal, *Predicting hospital-acquired acute kidney injury--a case-controlled study*. Ren Fail, 2008. **30**(9): p. 848-55.
133. KDIGO, *Kidney International Supplements, in Summary of Recommendation Statements*. 2012, Elsevier BV. p. 8-12.
134. Thakar, C.V., et al., *ARF after open-heart surgery: Influence of gender and race*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(4): p. 742-51.
135. Hsu, C.Y., et al., *The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. **74**(1): p. 101-7.
136. Palomba, H., et al., *Acute kidney injury prediction following elective cardiac surgery: AKICS Score*. Kidney Int, 2007. **72**(5): p. 624-31.
137. Visseren, F.L.J., et al., *2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice*. Eur Heart J, 2021. **42**(34): p. 3227-3337.
138. Demirjian, S., et al., *Predictive Accuracy of a Perioperative Laboratory Test–Based Prediction Model for Moderate to Severe Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery*. JAMA, 2022. **327**(10): p. 956-964.
139. O'Brien, S.M., et al., *The Society of Thoracic Surgeons 2018 Adult Cardiac Surgery Risk Models: Part 2-Statistical Methods and Results*. Ann Thorac Surg, 2018. **105**(5): p. 1419-1428.
140. Surgeons, S.o.T. *STS-Score risk calculator*. o. J. [cited 2023 29.05.2023]; Available from: <https://riskcalc.sts.org/stswebriskcalc/calculate>.
141. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
142. Cleveland Clinic. *Cleveland Clinic Score Calculator*. o. J. [cited 2023 29.05.2023]; Available from: <https://riskcalc.org/AKIpostCardiacSurgery/>.
143. Vaara, S.T., et al., *Restrictive fluid management versus usual care in acute kidney injury (REVERSE-AKI): a pilot randomized controlled feasibility trial*. Intensive Care Med, 2021. **47**(6): p. 665-673.
144. 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.
145. Hanžek, I., et al., *Allergic reactions to colloid fluids in anesthesia*. Psychiatr Danub, 2020. **32**(Suppl 4): p. 429-431.

146. Lagny, M.-G., et al., *Hydroxyethyl Starch 130/0.4 and the Risk of Acute Kidney Injury After Cardiopulmonary Bypass: A Single-Center Retrospective Study*. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2016. **30**(4): p. 869-875.
147. Delanaye, P., E. Cavalier, and H. Pottel, *Serum Creatinine: Not So Simple!* Nephron, 2017. **136**(4): p. 302-308.
148. Benoit, S.W., E.A. Ciccia, and P. Devarajan, *Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments*. Expert Rev Mol Diagn, 2020. **20**(10): p. 1019-1026.
149. Eghbalzadeh, K., et al., *Impact of preoperative elevated serum creatinine on long-term outcome of patients undergoing aortic repair with Stanford A dissection: a retrospective matched pair analysis*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2018. **12**(11): p. 289-298.
150. Oliveira, M.A.B., et al., *Effect of Preoperative Creatinine Levels on Mortality after Coronary Artery Bypass Grafting Surgery: an Observational Study*. Braz J Cardiovasc Surg, 2019. **34**(2): p. 149-155.
151. Murty, M.S., et al., *Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury*. Indian J Nephrol, 2013. **23**(3): p. 180-3.
152. Shlipak, M.G., et al., *Presurgical serum cystatin C and risk of acute kidney injury after cardiac surgery*. Am J Kidney Dis, 2011. **58**(3): p. 366-73.
153. Koyner, J.L., et al., *Urinary cystatin C and acute kidney injury after cardiac surgery*. Am J Kidney Dis, 2013. **61**(5): p. 730-8.
154. Zakaria, M., et al., *Role of serum cystatin C in the prediction of acute kidney injury following pediatric cardiac surgeries: A single center experience*. Medicine (Baltimore), 2022. **101**(49): p. e31938.
155. Alesawi, A., et al., *Cystatin C for early detection of acute kidney injury after laparoscopic partial nephrectomy*. Urol Ann, 2014. **6**(4): p. 298-304.
156. Gu, G., et al., *Elevation of preoperative cystatin C as an early predictor of contrast-induced nephropathy in patients receiving percutaneous coronary intervention*. Singapore Med J, 2022. **63**(8): p. 450-455.
157. Peng, H., et al., *ROCK1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20304.
158. Russo, L.M., et al., *The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states*. Kidney Int, 2007. **71**(6): p. 504-13.
159. Ryan, G.B. and M.J. Karnovsky, *Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function*. Kidney Int, 1976. **9**(1): p. 36-45.

160. Solez, K., L.C. Racusen, and A. Whelton, *Glomerular epithelial cell changes in early postischemic acute renal failure in rabbits and man*. *Am J Pathol*, 1981. **103**(2): p. 163-73.
161. Stehouwer, C.D.A. and Y.M. Smulders, *Microalbuminuria and Risk for Cardiovascular Disease: Analysis of Potential Mechanisms*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006. **17**(8): p. 2106-2111.
162. Grams, M.E., et al., *Albuminuria and estimated glomerular filtration rate independently associate with acute kidney injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21**(10): p. 1757-64.
163. James, M.T., et al., *A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Diabetes Mellitus, and Hypertension With Acute Kidney Injury*. *Am J Kidney Dis*, 2015. **66**(4): p. 602-12.
164. Colhoun, H.M. and M.L. Marcovecchio, *Biomarkers of diabetic kidney disease*. *Diabetologia*, 2018. **61**(5): p. 996-1011.
165. Salazar, J.H., *Overview of Urea and Creatinine*. *Laboratory Medicine*, 2014. **45**(1): p. e19-e20.
166. Arihan, O., et al., *Blood Urea Nitrogen (BUN) is independently associated with mortality in critically ill patients admitted to ICU*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0191697.
167. He, T., et al., *Blood Urea Nitrogen to Serum Albumin Ratio in the Prediction of Acute Kidney Injury of Patients with Rib Fracture in Intensive Care Unit*. *Int J Gen Med*, 2022. **15**: p. 965-974.
168. Vermeulen Windsant, I.C., et al., *Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study*. *Crit Care*, 2012. **16**(3): p. R95.
169. Karkouti, K., *Transfusion and risk of acute kidney injury in cardiac surgery*. *Br J Anaesth*, 2012. **109 Suppl 1**: p. i29-i38.
170. Koch, C.G., et al., *Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(12): p. 1229-39.
171. Vourc'h, M., et al., *Transfusion-Related Renal Dysfunction After Cardiac Surgery*. *JACC: Basic to Translational Science*, 2022. **7**(7): p. 627-638.
172. Gupta, R., *Red Blood Cell Transfusion and Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury*. *JACC Basic Transl Sci*, 2022. **7**(7): p. 639-641.
173. 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.
174. Kindzelski, B.A., et al., *Postoperative acute kidney injury following intraoperative blood product transfusions during cardiac surgery*. *Perfusion*, 2018. **33**(1): p. 62-70.

175. Garg, A.X., et al., *Safety of a Restrictive versus Liberal Approach to Red Blood Cell Transfusion on the Outcome of AKI in Patients Undergoing Cardiac Surgery: A Randomized Clinical Trial*. J Am Soc Nephrol, 2019. **30**(7): p. 1294-1304.
176. Macdougall, I.C. and T. Richards, *Restricting Red-Cell Transfusions in Cardiac Surgery: No Increase in AKI*. J Am Soc Nephrol, 2019. **30**(7): p. 1143-1144.
177. Peng, K., et al., *Society of Cardiovascular Anesthesiologists Clinical Practice Update for Management of Acute Kidney Injury Associated With Cardiac Surgery*. Anesth Analg, 2022. **135**(4): p. 744-756.
178. Sponholz, C., et al., *Catecholamine and volume therapy for cardiac surgery in Germany-- results from a postal survey*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103996.
179. Pickkers, P., et al., *Acute kidney injury in the critically ill: an updated review on pathophysiology and management*. Intensive Care Med, 2021. **47**(8): p. 835-850.
180. Gordon, A.C., et al., *Effect of Early Vasopressin vs Norepinephrine on Kidney Failure in Patients With Septic Shock: The VANISH Randomized Clinical Trial*. Jama, 2016. **316**(5): p. 509-18.
181. Vandenberghe, W., et al., *Impact of mean perfusion pressure and vasoactive drugs on occurrence and reversal of cardiac surgery-associated acute kidney injury: A cohort study*. J Crit Care, 2022. **71**: p. 154101.
182. Walsh, M., et al., *Relationship between intraoperative mean arterial pressure and clinical outcomes after noncardiac surgery: toward an empirical definition of hypotension*. Anesthesiology, 2013. **119**(3): p. 507-15.
183. Lackner, K.J. and D. Peetz, *Kreatinkinase-Isoformen*, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1404-1405.
184. Stanley, M., et al., *Rhabdomyolysis*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
185. Huerta-Alardín, A.L., J. Varon, and P.E. Marik, *Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians*. Crit Care, 2005. **9**(2): p. 158-69.
186. Simpson, J.P., et al., *Rhabdomyolysis and acute kidney injury: creatine kinase as a prognostic marker and validation of the McMahon Score in a 10-year cohort: A retrospective observational evaluation*. Eur J Anaesthesiol, 2016. **33**(12): p. 906-912.
187. Xiao, L., et al., *Serum creatine kinase levels are not associated with an increased need for continuous renal replacement therapy in patients with acute kidney injury following rhabdomyolysis*. Ren Fail, 2022. **44**(1): p. 893-901.
188. Talving, P., et al., *Relationship of creatine kinase elevation and acute kidney injury in pediatric trauma patients*. J Trauma Acute Care Surg, 2013. **74**(3): p. 912-6.

189. Khan, F.Y., *Rhabdomyolysis: a review of the literature*. Neth J Med, 2009. **67**(9): p. 272-83.
190. Li, N., et al., *Myoglobin promotes macrophage polarization to M1 type and pyroptosis via the RIG-I/Caspase1/GSDMD signaling pathway in CS-AKI*. Cell Death Discov, 2022. **8**(1): p. 90.
191. Lima, R.S.A., et al., *Acute Kidney Injury due to Rhabdomyolysis*. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation, 2008. **19**(5): p. 721-729.
192. Clarkson, P.M., et al., *Serum creatine kinase levels and renal function measures in exertional muscle damage*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(4): p. 623-7.
193. Pöyhönen, P., et al., *Peak CK-MB has a strong association with chronic scar size and wall motion abnormalities after revascularized non-transmural myocardial infarction - a prospective CMR study*. BMC Cardiovasc Disord, 2018. **18**(1): p. 27.
194. Ronco, C., et al., *Cardiorenal Syndrome*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **52**(19): p. 1527-1539.
195. Vandenberghe, W., et al., *Acute Kidney Injury in Cardiorenal Syndrome Type 1 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Cardiorenal Medicine, 2015. **6**(2): p. 116-128.
196. Ziebig, R., et al., *Renal elimination of troponin T and troponin I*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1191-3.
197. Ellis, K., A.W. Dreisbach, and J.L. Lertora, *Plasma elimination of cardiac troponin I in end-stage renal disease*. South Med J, 2001. **94**(10): p. 993-6.
198. van der Linden, N., et al., *Origin of Cardiac Troponin T Elevations in Chronic Kidney Disease*. Circulation, 2017. **136**(11): p. 1073-1075.
199. Mosa, O.F., *Prognostic Significance of Serum NGAL and Troponin I against Acute Kidney Injury in Egyptian ICU Patients after Open Heart Surgery: A Pilot Study*. Kidney Dis (Basel), 2018. **4**(4): p. 246-254.
200. Levantini, E., *Is miR therapeutic targeting still a miRage?* Front Biosci (Landmark Ed), 2021. **26**(10): p. 680-692.
201. Newbury, L.J., et al., *miR-141 mediates recovery from acute kidney injury*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 16499.

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Daniela Kaierle. Dani, danke für deine Hilfe über die gesamte Strecke dieser Dissertation, danke für deine Geduld, dein Verständnis und danke, dass du immer zu mir hältst. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen.

An nächster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Timo Brandenburger danken, für die anhaltende Begleitung während der Arbeiten und das Feedback während des Schreibens. Vielen Dank für deine Geduld und dein Durchhaltevermögen.

Mein weiterer Dank gilt den Leuten, die mich bei der Durchführung dieser Studie auf der Intensivstation und im Labor unterstützt haben. Im Einzelnen sind dies Dr. Thomas Dimski, Dr. Annette Legler, Dr. Erik Michael, PD Dr. Christian Vollmer, Prof. Detlef Kindgen-Milles, Dr. Manon Schleich, Laura Huthmann, Prof. Payam Akhyari, Prof. Udo Boeken, Prof. Inge Bauer, Claudia Dohle, PD Dr. Annika Raupach, Dr. Mirco Castoldi und Dr. Pablo Verde. Vielen Dank!

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und den Freunden, die quasi dazu gehören danken. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Danke!