

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Lenard Conradi

Die Bedeutung zellfreier DNA als prognostischer Marker bei kardiochirurgischen Risikopatienten für die späte akute Nierenschädigung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Aldo Daka
aus Kavajë, Albanien

promoviert am 16. April 2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Gereon R. Fink
1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. A.-N. Paunel-Görgülü
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. S. P. Brähler

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe, die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü
Herrn Univ.-Prof. Dr. Thorsten Wahlers
Frau Priv.-Doz. Dr. Julia Merkle-Storms
Frau Priv.-Doz. Dr. Antje-Christin Deppe

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Beiträge an der publizierten klinisch-experimentellen Arbeit:

Entwurf der klinisch-experimentellen Arbeit:	Antje C. Deppe, Adnana Paunel-Görgülü
Datenerhebung:	Aldo Daka
Formalanalyse:	Julia Merkle-Storms, Adnana Paunel-Görgülü
Fördermittelakquise:	Thorsten Wahlers
Investigation:	Aldo Daka.
Project administration:	Antje C. Deppe
Supervision:	Julia Merkle, Adnana Paunel-Görgülü
Validation:	Adnana Paunel-Görgülü, Julia Merkle-Storms, Thorsten Wahlers,

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz wurde durch meine Mitarbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie erstellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden durch meine Mitarbeit im Labor der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie ermittelt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü durchgeführt worden.

Die verwendeten Fallberichte wurden von mir selbst ausgewertet. Die Nachuntersuchungen und Laborbestimmungen der Patientenproben wurden durch mich durchgeführt.

Die auf der Krankenstation der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universität zu Köln durchgeführten Untersuchungen habe ich unter Aufsicht der Stationsärztin Frau Priv.-Doz. Dr. Julia Merkle-Storms vorgenommen. Die Untersuchungen im Forschungslabor haben Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü und ich gemeinsam vorgenommen und ausgewertet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Adnana Paunel-Görgülü, die immer für mich Zeit gefunden hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich ausgezeichnet betreut hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Privatdozentin Dr. Julia Merkle-Storms sowie bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Thorsten Wahlers, die immer für mich Zeit gefunden haben, mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dem gesamten Team der des Forschungslabors und Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie danke ich für die großartige Unterstützung.

Für meine Eltern
Lindita & Qerem

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. AKI (akute Nierenschädigung) und Herzoperationen	10
2.2. AKI-Pathophysiologie und Inflammation	11
2.3. AKI im klinischen Alltag	13
2.3.1. Präoperative Risikofaktoren	14
2.3.2. AKI-Formen	14
2.3.2.1. Prärenale AKI	14
2.3.2.2. Postrenale AKI	14
2.3.2.3. Intrarenale AKI	14
2.4. Aufbau der cfDNA	15
2.5. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der cfDNA	15
2.6. cfDNA als Biomarker bei anderen Krankheitsbildern	16
2.7. Biomarker für AKI	16
2.7.1. NGAL als Biomarker	17
2.7.2. Serumkreatinin	17
2.8. Aufbau der Studie	17
2.9. Ziele der Arbeit	18
3. PUBLIKATION (MATERIAL, METHODEN UND ERGEBNISSE)	18
4. DISKUSSION	34
4.1. Zusammenhang AKI und herzchirurgische Eingriffe	34
4.2. cfDNA als Biomarker	35

4.3.	Vergleich der cfDNA zu NGAL und Kreatinin	36
4.4.	Limitationen der Studie	38
5.	LITERATURVERZEICHNIS	40

Abkürzungsverzeichnis

AKI	– acute kidney injury
CPB	– cardiopulmonary bypass
cfDNA	– cell free DNA
NETs	– neutrophil extracellular traps
NGAL	– neutrophil gelatinase associated lipocalin
IL-18	– Interleukin 18
IL-6	– Interleukin 6
TNF- α	– Tumornekrosefaktor α
ROC	– receiver operating characteristic
AUC	– area under the curve
SIRS	– systemic inflammatory response syndrome
AKIN	– acute kidney injury network
DAMP	– danger associated molecular pattern
TLR2	– toll-like-receptor 2
TLR4	– toll-like-receptor 4
ACE	– angiotensin converting enzyme
n	– Anzahl
CRP	– c reaktives Protein
KDIGO	– Kidney Disease Improving Global Outcomes
CABG	– Coronary Artery Bypass Graft

❖ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in vorliegender Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter

1. Zusammenfassung

Diese Studie befasst sich mit der prognostischen Bedeutung zellfreier DNA nach Bypassoperationen am Herzen unter Einsatz der Herzlungenmaschine im Zusammenhang mit akuter Nierenschädigung (AKI). Durch den Einsatz einer Herzlungenmaschine werden sowohl physiologische Mechanismen beeinflusst als auch das Immunsystem aktiviert, was zu einer systemischen Inflammation mit Aktivierung von unter anderem neutrophilen Granulozyten führt. Neutrophile Granulozyten können durch Freisetzung extrazellulärer Neutrophilenfallen (neutrophil extracellular traps - NETs) zusätzliche Gewebeschäden bewirken. Durch die Induktion von Apoptose und Zellnekrosen im Rahmen der Inflammation wird ebenfalls nukleäre DNA freigesetzt, was zu einem Anstieg der zirkulierenden zellfreien DNA (cfDNA) führt.

In dieser prospektiven Studie wurden 58 Patienten eingeschlossen, welche alle unter Einsatz der Herzlungenmaschine eine Bypassoperation erhielten. 21 Patienten entwickelten eine AKI (drei davon dialysepflichtig) und 37 Patienten wiesen eine normale Nierenfunktion innerhalb des Beobachtungszeitraums auf. Fünf Patienten der AKI-Gruppe verstarben im postoperativen Verlauf.

In allen Patienten wurden sowohl präoperativ, als auch unmittelbar postoperativ, sowie am ersten, zweiten, dritten und fünften postoperativen Tag die Biomarker Kreatinin, Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertem Lipocalin (NGAL) und cfDNA/NETs im Blutplasma quantifiziert. Die Bewertung des Prognosewertes der Biomarker bezüglich eines AKI erfolgte anhand von ROC-Kurven (receiver operating characteristic curve). Erfasst wurden außerdem perioperative Voraussetzungen wie Vorerkrankungen, Medikation, BMI und Geschlecht der Patienten, sowie die Dauer und Art des Eingriffes bzw. der Zeitraum unter Einsatz der Herzlungenmaschine. Miteinbezogen wurde auch die Verweildauer auf Intensivstation und die Ein-Jahres-Mortalität.

Die Analyse der Plasmaspiegel zeigte, dass die cfDNA- und NGAL-Spiegel bei AKI-Patienten stark anstiegen, im Gegensatz zur Nicht-AKI-Gruppe. Diese Unterschiede konnten auch bis Tag 3 bzw. Tag 5 nach der Operation beobachtet werden. Im Vergleich zur Gruppe mit früher AKI waren die cfDNA-Spiegel bei Patienten, die eine späte AKI (>24 Stunden postoperativ) entwickelten, signifikant erhöht.

Bei der Entwicklung einer frühen AKI (innerhalb der ersten 24 Stunden postoperativ) hingegen zeigten die Biomarker NGAL und Kreatinin im Vergleich zur cfDNA eine höhere Signifikanz. NGAL konnte somit in den ersten 24 Stunden nach Operation als ein valider Vorhersageparameter für die frühe AKI verwendet werden. Als präziser Prädiktor für die späte AKI konnte am dritten postoperativen Tag die cfDNA mit einem Schwellenwert von 260,53 ng/ml (AUC = 0,804) ermittelt werden; im Vergleich dazu zeigten NGAL (AUC = 0,699) und Kreatinin (AUC = 0,688) eine geringere AUC.

Es deutete sich ein Zusammenhang zwischen erhöhter Mortalität und dem Anstieg von NGAL an. Dieser konnte in Bezug auf cfDNA nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten insgesamt darauf hin, dass die Bestimmung der cfDNA-Spiegel ab dem ersten postoperativen Tag ein wertvolles Instrument zur Vorhersage von später AKI nach Herzoperationen mit Herzlungenmaschineneinsatz sein könnte.

2. Einleitung

2.1. AKI (akute Nierenschädigung) und Herzoperationen

Die Koronararterienbypassoperation (CABG) hat sich als eine der wichtigsten Therapieformen zur Verlängerung des Überlebens und zur Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) erwiesen¹. Eine Koronararterienbypass-Operation wird als Hochrisikoverfahren angesehen, das mit einer 30-Tage-Morbiditäts- und Mortalitätsrate von jeweils bis zu 14,0 % bzw. 2,4 % einhergeht^{2 3}. Das typische Operationsverfahren dauert drei bis vier Stunden. Der Krankenhausaufenthalt umfasst in der Regel fünf bis sieben Tage. Die Patienten benötigen nach der Entlassung sechs bis zwölf Wochen, um sich vollständig zu erholen⁴.

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, eine CABG durchzuführen: On-Pump-CABG und Off-Pump-CABG. Der Beginn beider Eingriffe ist sehr ähnlich, ein Chirurg entnimmt Blutgefäße aus den Extremitäten oder der Brust⁵ und implantiert diese am Herzen als Ersatz für die nicht mehr funktionsfähigen Herzkranzgefäße.

Bei der On-Pump-CABG wird eine iatrogene Asystolie erzeugt, während die Blutversorgung des Körpers durch die Herzlungenmaschine aufrechterhalten wird⁵.

Bei der Off-Pump-CABG transplantiert der Chirurg das Blutgefäß am schlagenden Herzen ohne den Einsatz einer Herzlungenmaschine.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Patienten die sich einer On-Pump-Operation unterzogen haben eingeschlossen.

Weltweit werden jährlich mehr als zwei Millionen Herzoperationen durchgeführt⁶. Zu den schwerwiegenden Komplikationen zählt unter anderem die akute Nierenschädigung (AKI, acute kidney injury). Die akute Nierenschädigung, früher "akutes Nierenversagen", gilt allgemein als häufige Komplikation bei Herzoperationen⁷. Die ursächliche Schädigung unterliegt einer multifaktoriellen Genese und wird unter anderem durch Ischämie, Toxizität und embolische Ereignisse^{8 9} verursacht. Die Diagnose von AKI umfasst im klinischen Alltag typischerweise die Messung der Serumkreatininkonzentration und der Urinausscheidung. Leitliniengerecht werden die Kriterien der „Kidney Disease: Improving Global Outcomes“ (KDIGO) zur Differenzierung der AKI empfohlen¹⁰.

Um weitere Nierenschädigungen zu vermeiden, ist das frühzeitige Erkennen dieser Risikofälle unerlässlich, damit eine sofortige Therapie mittels Flüssigkeitsmanagement und vasoaktiven Medikamenten eingeleitet werden kann ¹¹.

Durch die Verwendung von Fremdoberflächen im Rahmen der Herstellung eines extrakorporalen Kreislaufs (z.B. Filter und Plastikschläuche) kommt es zur Inflammation und somit zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems (SIRS). Diese kann zur Entwicklung postoperativer Komplikationen einschließlich der oben genannten AKI beitragen¹²⁻¹⁴. Abhängig von Definition und Art des Eingriffs in den verschiedenen Studien schwankt die Inzidenz postoperativer AKI zwischen 5 und 42% ^{7 15}.

Blutungskomplikationen sowie Inflamationsprozesse können zu einer Nierenminderdurchblutung führen. Durch HLM-induzierte Veränderungen der Hämodynamik kommt es zu einem erniedrigtem Herzzeitvolumen während des operativen Eingriffs, was ein häufiger Auslöser für die AKI in der frühen postoperativen Phase ist ^{16 17}. Auch eine kurzweilige persistierende Organischämie der Niere kann eine strukturelle tubuläre Schädigung auslösen. Hierbei führt eine Störung der renalen tubulären Epithelzellen zu einer tubulären Dysfunktion. Eine renale Minderdurchblutung sowie tubuläre Zellschädigung tritt vor allem bei oxidativem Stress und inflammatorischen Ereignissen auf ¹⁸. Durch den Kontakt mit dem extrakorporalen Kreislauf werden beispielsweise Cytokine wie Interleukin (IL)-6 und -10, aber auch das Komplementsystem aktiviert, was zu einer vermehrten Endotheldysfunktion, Thrombozytenaktivierung und somit zur Zellschädigung führt ¹⁹.

Da es bislang keine klinisch etablierte spezifische effektive Therapie für AKI nach Herzoperationen gibt, kann die Identifizierung neuartiger und sensitiver Biomarker, die eine AKI bereits vor der klinischen Diagnose erkennen können, von Vorteil für die Entwicklung neuer Präventionsstrategien sein. Hierzu wurde beispielsweise die Wirkung von ACE-Hemmern auf die Verminderung von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) zur Reduktion prokoagulatorischer Faktoren untersucht, jedoch kam auch heraus, dass durch den vermehrten Anfall von Bradykinin auch das IL-6 erhöht wird. Die Rolle von ACE-Hemmern muss noch weiter untersucht werden ¹⁹. Auch gibt es Untersuchungen mit verschiedenen Biofilmen, welche das extrakorporale System auskleiden, um ein natürlicheres Umfeld und damit weniger Immunaktivierung zu provozieren. Die Ergebnisse zeigten bislang jedoch noch keine signifikanten Erfolge ¹⁹.

2.2. AKI-Pathophysiologie und Inflammation

Eine Inflammation ist eine komplexe Reaktion, die dazu dient, schädliche Krankheitserreger zu beseitigen und die Gewebereparatur nach einer Verletzung einzuleiten. Eine übermäßige und ungezielte Inflammation kann jedoch Autoimmunerkrankungen, Fibrose und Gewebeschäden begünstigen ²⁰.

Innerhalb der Nieren wird die Rekrutierung von Immunzellen durch den vermehrten Einsatz von Adhäsionsmolekülen auf Zellebene ermöglicht ²¹. Hier wird verdeutlicht, dass die Niere ein hochsensibles Organ gegenüber einer Inflammation darstellt. Der Zusammenhang zwischen Inflammation und cfDNA wird im Folgenden beschrieben.

Nach einer akuten Gewebeschädigung sind Zellschäden und die dadurch entstehenden DAMPs (damage associated molecular patterns) laut früherer Studien die Hauptauslöser für Entzündungen ²². Renale tubuläre Epithelzellen sind äußerst anfällig für intrinsischen oxidativen Stress, vornehmlich während der Reperfusionsphase ^{20 22 23}.

Gemäß früheren Studien können sich die Nieren nach einer AKI-Episode teilweise intrinsisch regenerieren, insofern die Schadensschwelle nicht überschritten wurde ^{24 25}. Allerdings sind die Nieren nicht in der Lage, neue Nephrone zu erzeugen. Rezidivierende AKI-Episoden führen zu weiterem Gewebsverlust, der letztlich mit chronischer Nierenerkrankung und terminaler Niereninsuffizienz einhergeht ^{25 26}.

Das akute Nierenversagen hat viele heterogene Ursachen, welche in den vorliegenden Punkten kurz erläutert wurden. Gemein ist allen jedoch, dass es aufgrund verschiedener Pathologien zu einer verminderten glomerulären Filtration und einer gestörten Entgiftungsfunktion kommt.

Im Falle einer herzchirurgischen Operation unter Einsatz der Herzlungenmaschine stehen vor allem Hypovolämie mit einhergehender Ischämie und immunologische Prozesse aufgrund des Traumas und die durch Fremdmaterial getriggerte systemische Inflammation im Vordergrund ²⁷. Bei einer AKI gehen vor allem die proximalen Tubulusepithelzellen zugrunde, bedingt durch eine Störung des Zellzyklus ²⁸. Profibrotische und inflammatorische Faktoren, wie beispielsweise TGF (transforming growth factor) beta 1 Protein und CTGF (connective tissue growth factor), fördern die Fibrosierung und Dysfunktion des Epithels ²⁸. In einer Studie aus dem Jahr 2020 wurde gezeigt, dass der in der Niere ansässige Fibroblast, welcher auch EPO (Erythropoetin) produziert, als Antwort auf Schädigung seinen Phänotyp verändert und dabei die Fähigkeit zur EPO-Produktion verliert ²⁹. Auch scheint die mitochondriale Dysfunktion eine große Rolle in der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz zu spielen ^{30 31}, insbesondere bei durch Ischämie induzierter AKI. Durch die Hypoxie werden vermehrt freie Sauerstoffradikale freigesetzt, welche unter anderem Proteine und Lipide zerstören und so zur Apoptose der Epithelzellen beitragen ³⁰.

Zusammenfassend kann die Niere durch externe Stressoren wie eine Operation (in diesem Fall aggraviert durch den Einsatz von Fremdoberflächen) sowie autogen durch komplexe immunologische Prozesse geschädigt und sogar langfristig in ihrer Funktion eingeschränkt werden.

Grundlegend gilt, dass jegliche Operation ein Trauma darstellt, durch welches eine systemische Inflammation in Gang gesetzt wird. So auch bei kardiochirurgischen Operationen

unter Verwendung der Herzlungenmaschine. Hierbei könnte die Inflammation durch den Einsatz von Fremdkörpern noch verstärkt werden. Es kommt zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Ausbildung von NETs, welche zu oxidativem Stress führen, Endorgane wie die Niere schädigen und so eine AKI hervorrufen können ^{32 33}. Eine genauere Erläuterung diesbezüglich erfolgt im Abschnitt 2.5.. Zunächst werden neutrophile Granulozyten aktiviert, wodurch die Expression von unter anderem TLR-9 (toll-like-receptor-9) ^{34,35 36} durch die Erkennung von DAMPS (damage associated molecular patterns) initiiert wird. Somit wird die angeborene Immunantwort aktiviert ³⁴.

Durch den Einsatz einer Herzlungenmaschine kann es sowohl durch manuelle Manipulation als auch durch den Kontakt zu Fremdoberflächen zu einer Thrombozytenaktivierung und durch Inflammation unter anderem zur vermehrten Freisetzung von PAI-1 kommen, was zu einer vermehrten Bildung von Mikroembolien führt ¹⁹. Diese führen durch das Eindringen in die Nierenkapillaren zu Schäden ³⁷. Zwar werden bei Bypassoperationen Systemfilter eingesetzt, diese können jedoch nur Thromben bis 40 µm abfangen. Kleinere Thromben können wieder in den Systemkreislauf gelangen ³⁷. Ein weiterer Schädigungsmechanismus ist die Freisetzung von Histonen (in jeder DNA enthalten) durch untergegangene Zellen aus den Nierentubuli. Hier werden beispielweise TLR-2 und TLR-4 aktiviert, was zur verstärkten Inflamationsreaktion führt und die Schädigung von Nierengewebe vorantreibt ³⁸.

Zusätzlich trägt die Freisetzung von freiem Hämoglobin im Rahmen der Hämolyse zu einer Schädigung der Nierentubuli sowie zu einem erhöhten systemischen Gefäßwiderstand und Störungen der Blutplättchen- und Gerinnungsaktivität bei ³⁹.

2.3. AKI im klinischen Alltag

Die akute Nierenschädigung ist als eine plötzliche und oft reversible Verringerung der Nierenfunktion, gemessen an der glomerulären Filtrationsrate (GFR), definiert ⁴⁰. Unmittelbar nach einem renalen Schaden können die Kreatinin- und Harnstoffwerte im Normbereich sein, sodass sich Aussagen über eine AKI nur anhand der Urinausscheidung oder anderen modernen Biomarkern treffen lassen können.

Die verschiedenen Stadien der AKI wurden gemäß dem AKIN-Klassifizierungssystem (Acute Kidney Injury Network) innerhalb der ersten fünf Tage nach der Operation eingeteilt ⁴¹. Die AKI im Stadium I ist definiert als ein Anstieg des Blutkreatinins um 0,3 mg/dL innerhalb von 48 Stunden oder um mindestens 50% gegenüber dem Ausgangswert. Stadium II ist definiert als ein zweifacher Anstieg des Kreatinins gegenüber dem Ausgangswert. Die AKI im Stadium III ist definiert als ein dreifacher Anstieg des Kreatinins gegenüber dem Ausgangswert oder ein Anstieg des absoluten Wertes auf 4,0 mg/dL oder höher.

2.3.1. Präoperative Risikofaktoren

Zu den präoperativen AKI-Risikofaktoren zählen unter anderem fortgeschrittenes Alter, Diabetes mellitus, frühere Herzoperationen, chronische Nierenerkrankung, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Herzinsuffizienz, linksventrikuläre Ejektionsfraktion <35 %, Adipositas und möglicherweise das weibliche Geschlecht ⁴². In dieser Studie wurden die Risikofaktoren aller Studienteilnehmer sorgfältig erfasst und dokumentiert. Patienten mit einer präoperativ vorbekannten Nierenerkrankung waren nicht partizipierend in der Studie. Ebenfalls waren Patienten mit einer vorbekannten Immunsuppression nicht Teil der Studie.

2.3.2. AKI-Formen

Die Pathophysiologie der AKI wird traditionell in drei Kategorien unterteilt: prärenal, intrinsisch renal (intrarenal) und postrenal. Die Ursachen dieser Kategorien sind multifaktoriell, können jedoch überlappende Schädigungsmechanismen aufweisen ^{43 44}.

2.3.2.1. Prärenale AKI

Die prärenale AKI stellt die häufigste Art der Schädigung in Verbindung mit herzchirurgischen Eingriffen bei älteren Menschen dar ⁴⁵. Durch die renale Minderdurchblutung kommt es zu einer Reduktion der GFR (ohne Schädigung des Nierenparenchyms) als adaptive Reaktion auf verschiedene extrarenale Beeinträchtigungen ⁴⁶. Beispielhaft werden hier folgende Fälle aufgezählt: hämorrhagischer Schock, Volumenmangel, Herzinsuffizienz, Operation, sowie aufgrund Wirkungen oder Nebenwirkungen von Medikamenten, welche zu einer verminderten Perfusion der Niere führen können (z.B. Katecholamine, Prostaglandinhibitoren, ACE-Hemmer).

2.3.2.2. Postrenale AKI

Eine postrenale AKI entsteht durch eine Obstruktion der ableitenden Harnwege bzw. Störungen des Harnabflusses. Dies erhöht den intratubulären Druck, was zu einer Verringerung der GFR führt ⁴⁷. Beispielsweise werden hier die Prostatahypertrophie, abdominelle Neoplasie, Nephro- oder Urolithiasis genannt. In dieser Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, bei welchen eine solche Ursache ausgeschlossen werden konnte.

2.3.2.3. Intrarenale AKI

Die intrarenale AKI wird durch verschiedene Schädigungsmechanismen definiert, abhängig von der betroffenen Region innerhalb der Niere ⁴⁸. Die Einteilung erfolgt in tubuläre, vaskuläre, interstitiäre und glomeruläre Formen. Meistens liegt hier eine toxische oder ischämische

Genese vor ⁴⁸. Auch können autoimmune Prozesse ursächlich sein, beispielsweise im Fall einer Vaskulitis oder Lupusnephropathie.

2.4. Aufbau der cfDNA

Die cfDNA besteht aus doppelsträngigen Desoxynukleinsäurefragmenten, die eine Länge von weniger als 200 bp (Basenpaaren) haben. Das Molekulargewicht ist niedrig ^{49 50}.

Eine solche DNA-Struktur ist in der zellfreien Komponente von Vollblut wie Plasma und Serum sowie in anderen menschlichen Körperflüssigkeiten vorzufinden ^{51 52 53}. Die cfDNA ist nicht direkt mit Zellen verknüpft ⁵⁴, sondern bildet vielmehr Komplexe mit Proteinen oder membrangebundenen Strukturen ⁵⁵.

Die Konzentration der cfDNA im Blut kann erheblich schwanken; sie liegt bei kranken Patienten zwischen 0–5 und >1000 ng/ml und bei gesunden Probanden zwischen 0 und 100 ng/ml ^{56 57}. Auch wenn cfDNA am häufigsten im Plasma und Serum zu finden ist, kann diese jedoch auch in anderen Flüssigkeiten wie beispielsweise dem Urin enthalten sein ⁵⁸. Zellfreie Urin-DNA (ucfDNA) wird laut Studien aus epithelialen nekrotischen oder apoptotischen Zellen freigesetzt, die in direktem Kontakt mit dem Harntrakt stehen oder aus im Blut vorhandener cfDNA stammen ^{59 60}.

2.5. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der cfDNA

Die cfDNA wird aus nekrotischen und apoptotischen Zellen sowie durch aktivierte neutrophile Granulozyten durch den Prozess der NEToses freigesetzt ^{61 62}. Bei der Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine, aktivierte Thrombozyten ⁶¹, aktivierte Endothelzellen ⁶² oder Mikroorganismen, setzen neutrophile Granulozyten extrazelluläre Chromatinfasern in Form extrazellulärer Neutrophilenfallen frei (NETs – neutrophil extracellular traps) ⁶³, die mit neutrophilen Granulatproteinen wie Elastase und Myeloperoxidase beladen sind. Sie fangen somit eindringende Mikroorganismen ein. Jedoch können übermäßig viele in den Kreislauf freigesetzte NETs zu Gewebeschäden führen und wurden mit Zytotoxizität ⁶⁴, Thrombose ⁶⁵ und Autoimmunität ⁶⁶ assoziiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass die zirkulierenden cfDNA-Konzentrationen die Menge der im Blut freigesetzten NETs widerspiegeln ^{67 68}. Bei Polytraumapatienten korreliert daher die Konzentration zirkulierender cfDNA/NETs mit der Schwere der Schädigung ⁶⁷. Es wurde festgestellt, dass die cfDNA/NETs-Werte im Serum nach einer Herzoperation deutlich erhöht waren und es wurde außerdem von einer Korrelation mit perioperativer Nierenfunktionsstörung berichtet ⁶⁹. Darüber hinaus zeigte eine Metaanalyse, dass die Anwendung eines Leukozytenfilters die Nierenschädigung bei herzchirurgischen Patienten reduzierte ⁷⁰, was die Hypothese unterstützt, dass neutrophile

Granulozyten und Plasma-cfDNA/NETs eine Rolle bei der Pathogenese und Entwicklung von AKI spielen könnten.

Ein hoher cfDNA-Spiegel im Serum ist mit einer höheren Mortalität assoziiert. Dies vergegenwärtigt die Bedeutung der cfDNA als potentiell wertvollen Biomarker für die sepsisinduzierte AKI-Prognose ⁷¹. Bei Sepsis-Patienten konnten hohe cfDNA-Konzentrationen nachgewiesen werden ⁷².

2.6. cfDNA als Biomarker bei anderen Krankheitsbildern

Über die Existenz zirkulierender zellfreier DNA (cfDNA) wurde erstmals 1948 von Mandel und Métails berichtet. Sie beschrieben das Vorhandensein freier Nukleinsäuren im Blutplasma gesunder Probanden ⁷³.

In aktueller Zeit zeigt eine immer größer werdende Anzahl von Studien das wissenschaftliche Interesse an cfDNA und deren klinischer Anwendung. Die Quantifizierung der cfDNA-Konzentration dient als nichtinvasives Messinstrument bei akuten sowie chronischen Erkrankungen und kann bei verschiedenen Zuständen wie Gewebeschäden, Zelltod und Zellumsatz als diagnostischer Parameter angewendet werden ^{74 75 76,77}.

Auch bei Krebspatienten wurden in früheren Studien erhöhte cfDNA-Spiegel beobachtet. Hier konnte interessanterweise beobachtet werden, dass die Spiegel im fortgeschrittenen Tumorstadium höher als im Anfangsstadium waren ^{78 79}. Außerdem wurde gezeigt, dass die Gesamtmenge an zirkulierender cfDNA bei Krebspatienten höher als bei gesunden Probanden war ^{80,81}. Ein erhöhter cfDNA-Gehalt war jedoch nicht spezifisch für bösartige Erkrankungen. Erhöhte Werte wurden auch im Plasma schwangerer Frauen und bei Transplantationspatienten nachgewiesen ^{82,83}. Erhöhte cfDNA-Werte können möglicherweise auch im Rahmen physiologischer (z.B. körperlicher Belastung)^{84,85} und nicht-maligner pathologischer Prozesse wie Entzündungen, Diabetes mellitus, Gewebetrauma, Sepsis und Myokardinfarkt auftreten ^{86 87 88}.

Ebenfalls konnten im Beispiel der pulmonalen Hypertonie erhöhte Serum cfDNA-Spiegel festgestellt werden, welche mit der Schwere der Erkrankung korrelierten ⁸⁹.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass cfDNA nicht spezifisch für nephrologische Pathologien ist.

2.7. Biomarker für AKI

Die für AKI am häufigsten untersuchten und vielversprechenden Marker sind Plasma-Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) ^{90 91} und IL-18 (Interleukin 18) ⁹². In diesem Zusammenhang wurde unlängst der zirkulierenden zellfreien DNA (cfDNA) als ein gefahren-assoziiertes molekulares Muster (DAMP - danger-associated molecular pattern)

zunehmend Aufmerksamkeit gewidmet. Diese wurde unter anderem als klinischer Marker bei Krebs ⁹³, Trauma ⁹⁴ und Sepsis ^{95 96} eingesetzt.

2.7.1. NGAL als Biomarker

Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) ist ein Protein, das von aktivierten Neutrophilen freigesetzt wird ⁹⁷. In Bezug auf AKI-Vorhersagen wurde in mehreren aktuellen Studien die Aussagekraft von NGAL positiv hervorgehoben ⁹⁸.

NGAL stellt ein Akut-Phase-Protein dar und beteiligt sich an antibakteriellen Immunprozessen. Durch entzündliche Zytokine wird die NGAL-Expression in Neutrophilen, Epithelzellen oder Hepatozyten induziert ^{99 100 101}. Studien haben ferner gezeigt, dass Patienten mit verringerten NGAL-Werten eine höhere Anfälligkeit für verschiedene Infektionen aufweisen ¹⁰².

NGAL kann in den ersten zwei Stunden nach einer AKI im Plasma nachgewiesen werden, wobei der Höhepunkt der Konzentration erst nach sechs Stunden erreicht wird. Abfallende NGAL-Spiegel wurden etwa fünf Tage nach AKI beobachtet ¹⁰³. Erhöhte Serum-NGAL-Werte im Rahmen einer AKI konnten 24 Stunden früher als der Anstieg des Kreatinins nachgewiesen werden ^{104 105}.

Aufgrund der guten Studienlage von NGAL entschied ich mich in meiner Studie die cfDNA-Messungen im Sinne eines Vergleiches mit NGAL darzustellen.

2.7.2. Serumkreatinin

Kreatinin ist ein Stoffwechselprodukt des Kreatinphosphatabbaus der Muskulatur. Sein Nutzen besteht einerseits in einer annähernd konstanten Sekretionsrate durch die glomeruläre Filtration, während andererseits eine geringe bis kaum vorhandene Resorption erfolgt. Der Hauptnachteil ist die Abhängigkeit des Parameters von Muskelmasse, Muskelarbeit oder Medikamenteneinnahme ¹⁰⁶. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Serumkreatinin und GFR eine nichtlineare Beziehung aufweisen, was bedeutet, dass große Änderungen der GFR nur eine geringfügige Änderung des Serumkreatinins zur Folge haben ¹⁰⁷. Dies kann zur Unterdiagnostizierung einer AKI führen, da die Änderungen innerhalb des Referenzbereichs liegen könnten. Bluttests auf Kreatinin sind im Vergleich zu anderen aufgeführten Biomarkern deutlich günstiger.

2.8. Aufbau der Studie

In der vorliegenden Studie wurden die perioperativen cfDNA-Plasmaspiegel bei Patienten, die sich einer Herzoperation mit HLM unterziehen, analysiert, untersucht und ausgewertet. Für die Statistik wurden die Daten von Patienten, die postoperativ eine AKI entwickelten mit denen von Patienten, die postoperativ keine AKI entwickelten, verglichen. Somit wurde die

Anwendbarkeit von cfDNA als Prädiktor für AKI analysiert. Es wurde die Vorhersagekraft der cfDNA-Werte mit den etablierten AKI-Biomarkern NGAL und Kreatinin verglichen.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln genehmigt (Nr. 17–205). Zu diesem Zeitpunkt wurde von allen Teilnehmern eine schriftliche Einverständniserklärung zur Zulassung eingeholt. Im Zeitraum von September 2017 bis April 2018 wurden 58 Patienten im Alter von 60 Jahren oder älter, die sich einer Herzoperation mit Herzlungenmaschine mit einer Bypass-Dauer von ≥ 80 Minuten unterzogen haben, prospektiv aufgenommen. Die Patienten wurden bis August 2018 nachbeobachtet. Ausschlusskriterien für die Studie waren: Alter <60 Jahre, vorbekannte Dialysepflichtigkeit, immunologische Störungen oder systemische Immunsuppression, Infektion, Krebs, Schwangerschaft oder die Verweigerung der Studienteilnahme.

Die Blutproben wurden am Tag der Aufnahme, unmittelbar nach der Operation und postoperativ an Tag 1 (22–24 Stunden nach der Operation), Tag 2 (46–48 Stunden nach der Operation), Tag 3 (70–72 Stunden nach der Operation) und Tag 5 (118–120 Stunden nach der Operation) entnommen. Entnommene Plasmaproben wurden durch Zentrifugation (10 min bei $3000 \times g$) isoliert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.9. Ziele der Arbeit

Da die Möglichkeiten zur frühzeitigen Diagnostik einer AKI bei derzeitigem Stand mittels hauptsächlich Kreatinin und Urinausscheidung limitiert sind, stellt die AKI eine besondere Herausforderung dar. Der oben erwähnte Zusammenhang von Mortalität, Morbidität und längerer Hospitalisierung verstärkt noch einmal die Wichtigkeit der Entdeckung neuer Biomarker, um die Prognose und Prävention von AKI zu verbessern ¹⁰⁸.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Suche nach einem Biomarker, welcher helfen kann, frühzeitig AKI-Patienten zu identifizieren und somit durch rechtzeitige Intervention bzw. intensiviertes Monitoring die Prognose zu verbessern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Unterschiede sich im direkten Vergleich der AKI zur nicht-AKI-Gruppe zeigen in Bezug auf die Höhe der gemessenen Biomarker NGAL, cfDNA und Kreatinin. Auch sollte geklärt werden, in welchem AKI-Stadium bzw. zu welchem Zeitpunkt der AKI welcher Biomarker die beste Vorhersagekraft hat. Ebenfalls sollten die Spiegel der cfDNA insbesondere auf die Möglichkeit einer frühen Erkennung einer frühen und späten AKI untersucht werden. Ebenso sollte evaluiert werden, welche Aussagen sich bezüglich der Mortalität und Dialysepflichtigkeit daraus ergeben können.

3. Publikation (Material, Methoden und Ergebnisse)

RESEARCH ARTICLE

High levels of cell-free DNA accurately predict late acute kidney injury in patients after cardiac surgery

Julia Merkle[✉], Aldo Daka[✉], Antje C. Deppe, Thorsten Wahlers, Adnana Paunel-Görgülü^{✉*}

Department of Cardiothoracic Surgery, Heart Center of the University of Cologne, Cologne, Germany

[✉] These authors contributed equally to this work.

* adnana.paunel-goerguelue@uk-koeln.de



OPEN ACCESS

Citation: Merkle J, Daka A, Deppe AC, Wahlers T, Paunel-Görgülü A (2019) High levels of cell-free DNA accurately predict late acute kidney injury in patients after cardiac surgery. PLoS ONE 14(6): e0218548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548>

Editor: Lucio Careddu, Policlinico S. Orsola-Malpighi, ITALY

Received: January 24, 2019

Accepted: June 4, 2019

Published: June 18, 2019

Copyright: © 2019 Merkle et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors declared that no competing interests exist.

Abstract

Use of cardiopulmonary bypass in cardiac surgery triggers systemic inflammation by neutrophil activation leading to neutrophil extracellular traps (NETs) release. Hence, nuclear DNA released by necrotic and apoptotic cells might contribute to an increase in circulating cell-free DNA (cfDNA). cfDNA/NETs might induce endothelial damage and organ dysfunction. This study focuses on the accuracy of cfDNA to predict acute kidney injury (AKI) after on-pump surgery. 58 cardiac patients undergoing on-pump surgery were prospectively enrolled. Blood samples were taken preoperatively, immediately after surgery, at day 1, 2, 3 and 5 from patients with (n = 21) or without (n = 37) postoperative AKI development. Levels of cfDNA, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and creatinine in patients' plasma were quantified. ROC curves were used to assess the predictive value of the biomarkers for AKI. Further baseline characteristics and perioperative variables were analyzed. cfDNA and NGAL levels highly increased in AKI patients and significant intergroup differences (vs. non-AKI) were found until day 3 and day 5 after surgery, respectively. cfDNA levels were significantly elevated in patients who developed late AKI (>24 hours), but not in those with AKI development during the first 24 hours (early AKI). NGAL and creatinine, which were highest in patients with early AKI, accurately predicted during the first 24 postoperative hours (early AKI). At day 3, at a threshold of 260.53 ng/ml cfDNA was the best predictor for AKI (AUC = 0.804) compared to NGAL (AUC = 0.699) and creatinine (AUC = 0.688). NGAL, but not cfDNA, was strongly associated with AKI stages and mortality. Monitoring of cfDNA levels from the first postoperative day might represent a valuable tool to predict late AKI after on-pump surgery.

Introduction

Acute kidney injury (AKI) is widely recognized as a common complication of cardiac surgery and is associated with morbidity and mortality [1]. The use of cardiopulmonary bypass (CPB) during cardiac surgery and activation of blood cells by the non-physiological surfaces of filters

and elements of the extracorporeal circuit initiates a systemic inflammatory response (SIRS), contributing to the development of postsurgical complications including AKI. Indeed, a long operation time and CPB duration have been reported as risk factors for AKI [2–4]. According to the definition and surgery type, the incidence of postoperative AKI varies from 5 to 42% [1, 5]. As there is no effective therapy available for AKI after cardiac surgery, identifying novel and sensitive biomarkers able to detect AKI prior to its clinical diagnosis would be beneficial and might allow development of new preventive strategies. Most frequently studied and promising markers are plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) [6, 7] and IL-18 [8].

Recently, circulating cell-free DNA (cfDNA) has received increasing attention as a danger-associated molecular pattern and has been used as a clinical marker in cancer [9], trauma [10] and sepsis [11, 12] among others. cfDNA becomes released from necrotic and apoptotic cells as well as by activated neutrophils by a process called NETosis. Upon activation by proinflammatory cytokines, activated platelets [13], activated endothelial cells [14] or microorganisms, neutrophils release extracellular chromatin fibers in the form of neutrophil extracellular traps (NETs) [15], which are decorated with neutrophil granular proteins such as elastase and myeloperoxidase and trap invading microorganisms. However, excessive NETs release in the circulation may result in tissue injury and has been linked to cytotoxicity [16], thrombosis [17] and autoimmunity [18]. Previous studies have demonstrated that circulating cfDNA concentrations reflect the amount of NETs release in the blood [19, 20]. Hence, in multiple trauma patients, the concentration of circulating cfDNA/NETs correlates with the severity of injury [19]. Recently, serum cfDNA/NETs was found to be markedly elevated after cardiac surgery and correlation with perioperative renal dysfunction was reported [21]. Further on, a meta-analysis reported that leukocyte filter application reduced renal injury in cardiac surgery patients [22], supporting the hypothesis that neutrophils and plasma cfDNA/NETs might play a role for the pathogenesis and development of AKI. There is a strong need to identify suitable early and reliable markers for prediction of the development of postoperative kidney dysfunction. However, suitability and feasibility of plasma cfDNA/NETs as a marker for AKI development after cardiac surgery are currently not clear. In the present study, we analyzed perioperative plasma levels of cfDNA in patients undergoing cardiac surgery with CPB and subsequent AKI development and evaluated the feasibility of cfDNA as a predictor of kidney injury. We further compared the predictive value of cfDNA with the well-established AKI biomarkers plasma NGAL and creatinine.

Materials and methods

This study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Cologne (#17–205). Written informed consent was obtained from all participants at the time of admission. Fifty-eight patients undergoing on-pump cardiac surgery with estimated CPB duration ≥ 80 min and aged 60 years or older were enrolled prospectively in this study from September 2017 to April 2018. Patients were followed up until August 2018. Exclusion criteria for the study were: age < 60 years, patients undergoing hemodialysis; patients with immunological disorders or systemic immunosuppression, infection, cancer, pregnancy or patients who refused study participation.

AKI was defined according to the AKIN (acute kidney injury network) classification system [23] within the first five days post-surgery. Stage 1 AKI was an increase of blood creatinine ≥ 0.3 mg/dL within 48 hours or at least 50% increase from baseline. Stage 2 was a 2-fold increase from baseline creatinine. Stage 3 AKI is defined as a 3-fold increase from baseline creatinine or increase to ≥ 4.0 mg/dL.

The preoperative risk for operative mortality was evaluated by means of the additive and logistic EuroSCORE II.

Blood samples were collected at the day of admission, immediately after surgery and post-operatively at day 1 (22–24 hours post-surgery), day 2 (46–48 hours post-surgery), day 3 (70–72 hours post-surgery) and day 5 (118–120 hours post-surgery). Plasma samples were harvested by centrifugation (10 min at $3000 \times g$) and stored at -80°C until further processing.

Quantification of plasma cfDNA

Levels of cfDNA were quantified by Pico green staining as previously described [20].

Quantification of NGAL by ELISA

Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels were determined by using the Human Lipocalin-2/NGAL Duo Set Elisa (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA), MedCalc software and IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25 (IBM Corp. Released 2017. Armonk, NY: IBM Corp). Patient data are presented as box plots representing median (heavy line in boxes) with 25th and 75th percentiles. Whiskers indicate the minimum and maximum values, respectively. Statistical comparisons of continuous variables were performed using non-parametric Mann-Whitney U test for non-normally distributed variables, whereas categorical variables were assessed using Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test depending on the minimal expected count in each crosstab. Differences between more than two groups of non-parametric distributed data were determined by the Friedman test with Dunn as post hoc test. Correlations were evaluated by the Spearman correlation coefficient (r).

Areas under the curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) curves were determined and optimal cut-off values for plasma cfDNA, NGAL and creatinine levels for predicting AKIs were evaluated. The optimal cfDNA, NGAL and creatinine cut-off values were defined as the value that provided the highest sensitivity and specificity for predicting AKI. Univariate logistic regression was used to evaluate independent predictors of AKI after cardiac surgery. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Characteristics of the study cohort

Among all patients included in this study, 21 patients developed AKI (36%) after cardiac surgery, whereas 37 had an uneventful outcome. Baseline demographics and clinical variables are summarized in Table 1. There were no statistically significant differences in terms of baseline characteristics. Seven patients (33%) developed AKI during the first 24 hours after surgery (defined as early AKI), four patients (19%) at day 2, two patients (10%) at day 3 and eight patients (38%) at day 5 after surgery. In the AKI group, 14 patients (67%) suffered from mild postoperative AKI (stage 1) and 7 patients (33%) had moderate AKI (stage 2). No patient developed stage 3 AKI. Four patients with stage 2 AKI showed creatinine rise at day 1 after surgery and three patients were diagnosed with stage 2 AKI at day 2. Four patients with stage 2 AKI and one patient with stage 1 AKI died postoperatively. Of these patients, three patients developed stroke finally leading to death. One patient suffered from reduced left ventricular ejection fraction of 33% post-surgery provoking kidney injury and subsequent multiple organ

Table 1. Association of demographics and preoperative situation for non-AKI group an AKI group.

	non AKI group n = 37	AKI group n = 21	p-value
Age	70.0 (65.5;76.0)	72.0 (69.;78)	0.156
Height (cm)	171.0 (163;175)	170.0 (167;180)	0.422
Weight (kg)	77.0 (68;84)	79.0 (71;99)	0.190
Body mass index (kg/m ²)	26.5 (24;30)	27.5 (24;32)	0.419
Female gender n (%)	13 (35.1)	5 (23.8)	0.370
Male gender n (%)	24 (64.9)	16 (76.2)	0.370
LVEF >55% n (%)	30 (81.1)	15 (71.4)	0.515
Euroscore	6.0 (4;7)	7.0 (5;9)	0.086
Smoker/former Smoker n (%)	20 (54.1)	10 (47.6)	0.637
Hyperlipidemia n (%)	31 (83.8)	20 (95.2)	0.403
Triple vessel disease n (%)	18 (48.6)	8 (38.1)	0.437
Left main coronary artery stenosis n (%)	10 (27.0)	8 (38.1)	0.381
Carotid artery stenosis >50% n (%)	3 (8.1)	2 (9.5)	1.000
Prior hypertension n (%)	36 (97.3)	21 (100)	1.000
Prior myocardial infarction n (%)	8 (21.6)	3 (14.3)	0.729
Prior stroke n(%)	0 (0)	1 (4.8)	0.362
Prior cardiac surgery n (%)	2 (5.4)	5 (23.8)	0.086
Diabetes mellitus n (%)	11 (29.7)	7 (33.3)	0.776
COPD n (%)	4 (10.8)	4 (19.0)	0.443
Peripheral artery disease n (%)	6 (16.2)	6 (28.6)	0.320
Pulmonary hypertension n (%)	5 (13.5)	4 (19.0)	0.710
Preoperative beta blocker n (%)	20 (54.1)	15 (71.4)	0.194
Preoperative ACE inhibitor n (%)	15 (40.5)	9 (42.9)	0.863
Preoperative aspirin n (%)	28 (75.7)	15 (71.4)	0.723
Preoperative diuretics n (%)	12 (32.4)	11 (52.4)	0.136
Preoperative statin n (%)	26 (70.3)	18 (85.7)	0.187
Preoperative insulin n (%)	3 (8.1)	5 (23.8)	0.124
Preoperative antidiabetics n (%)	9 (24.3)	6 (28.6)	0.723

AKI, acute kidney injury; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; LVEF, left ventricular ejection fraction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.t001>

failure. Furthermore, one patient underwent re-exploration due to excessive postoperative bleeding and died due to development of AKI and multiple organ failure.

Table 2 gives an overview about the cardiac surgical procedures. Patients in the AKI group had significantly prolonged operation, bypass and aortic cross clamp time. Hence, the number of patients receiving venous grafts was significantly lower. Patients included in the AKI group were mechanically ventilated for a prolonged period, had a longer stay on the ICU and a higher mortality rate. Three patients required renal replacement therapy.

Perioperative changes of cfDNA and NGAL levels in patients undergoing on-pump surgery

Plasma levels of cfDNA and NGAL were quantified at the day of admission, after surgery, as well as at day 1, day 2, day 3 and day 5 after surgery. As depicted in Fig 1, cfDNA levels significantly increased after surgery in all patients, i.e. those with and without kidney injury (Fig 1A). Of note, patients who developed AKI during the first 5 days after surgery showed significantly elevated cfDNA levels immediately after surgery, at day 1, day 2 and day 3 when compared to

Table 2. Association of operative strategy for non-AKI group and AKI group.

	non AKI group	AKI group	p-value
CABG n(%)	15 (71.4)	6 (28.6)	0.362
AV replacement n(%)	2 (5.4)	1 (4.8)	1.000
CABG+AV repair	1 (2.7)	0 (0.0)	1.000
CABG+AV replacement	9 (24.3)	2 (9.5)	0.296
MV repair	2 (5.4)	0 (0.0)	0.530
MV replacement+TV repair	2 (5.4)	2 (9.5)	0.615
MV repair+TV replacement	0 (0.0)	1 (4.8)	0.362
MV repair+AV replacement	1 (2.7)	0 (0.0)	1.000
CABG+MV replacement	0 (0.0)	2 (9.5)	0.127
Aortic surgery+AV replacement	3 (8.1)	3 (14.3)	0.657
AV replacement +MV replacement	0 (0.0)	1 (4.8)	0.362
Aortic surgery +CABG	1 (2.7)	2 (9.5)	0.547
Duration of operation (h)	3.5 (3;4)	4.5 (4;6.0)	<0.001
Bypass time (min)	100.0 (82;115)	147.0 (101;209)	0.001
Aortic cross clamp time (min)	62.0 (46;80)	96.0 (69;126)	0.006
Number of anastomoses	2.0 (0.0;3.5)	2.0 (0.0;3.5)	0.785
Venous graft	23 (65.7)	12 (34.3)	0.003
Ventilation time (h)	11.0 (8.0;17.5)	17.0 (14;32)	0.004
Intensive care unit stay (d)	1.5 (1.0;3.0)	3.0 (2.5;8.5)	0.025
1-year Mortality	0 (0.0)	5 (23.8)	0.004

AKI, acute kidney injury; AV, aortic valve; CABG, coronary artery bypass graft; MV, mitral valve; PVL, paravalvular leak; TV, tricuspid valve.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.t002>

control patients with uneventful outcome. Similarly, NGAL also significantly increased after surgery and significant intergroup differences were found at least until day 5 after surgery (Fig 1B). However, in patients with postsurgical AKI development, NGAL levels were found to be already significantly increased at the day of admission suggesting a higher predisposition for postsurgical complications.

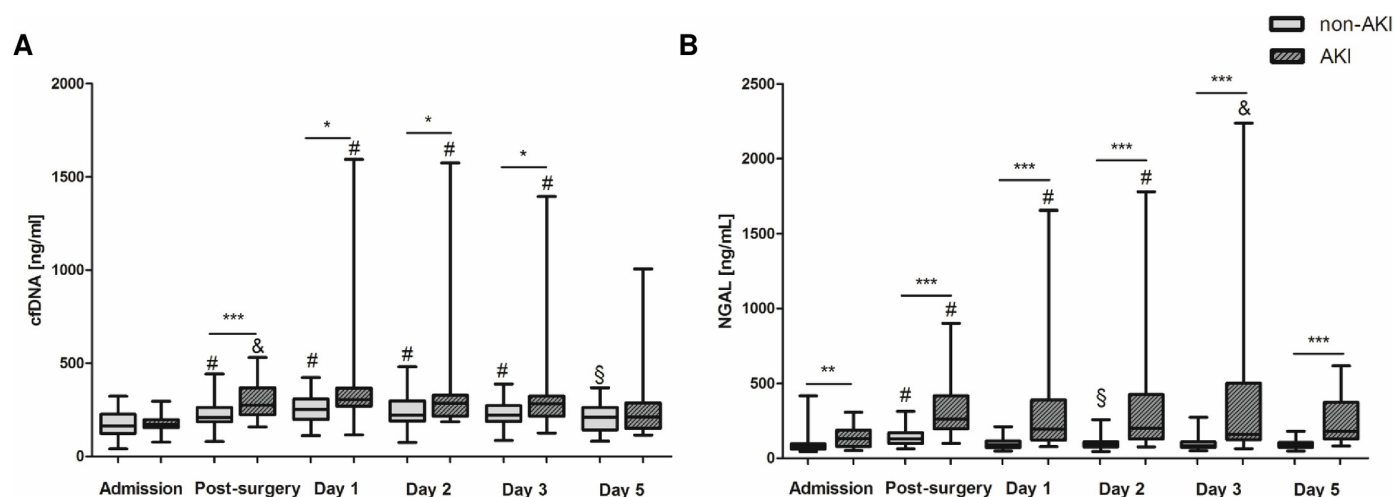


Fig 1. Kinetics of cfDNA/NETs and NGAL in patients undergoing cardiac surgery with CPB. cfDNA (A) and NGAL (B) levels were quantified in plasma of patients with (n = 21,) or without (n = 37) postoperative AKI development at the indicated times. &p<0.05, §p<0.01, #p<0.001 vs. admission; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.g001>

Positive correlation between cfDNA and plasma NGAL in patients with AKI development was already found immediately after surgery (Spearman's $Rho = 0.445$, $p = 0.04$). However, cfDNA did not correlate with NGAL at other times and no correlation with creatinine was found. Correlation of cfDNA and NGAL was not detected in patients without AKI.

Comparison between prognostic ability of plasma cfDNA, NGAL and creatinine for AKI after cardiac surgery

To study the feasibility of cfDNA as an AKI biomarker, receiver operating characteristic (ROC) analyses were performed. We further compared the area under the ROC curve (AUC) between plasma cfDNA, NGAL and creatinine at different time points (Fig 2). Moderate rise in serum creatinine levels after cardiac surgery has already been demonstrated to be associated

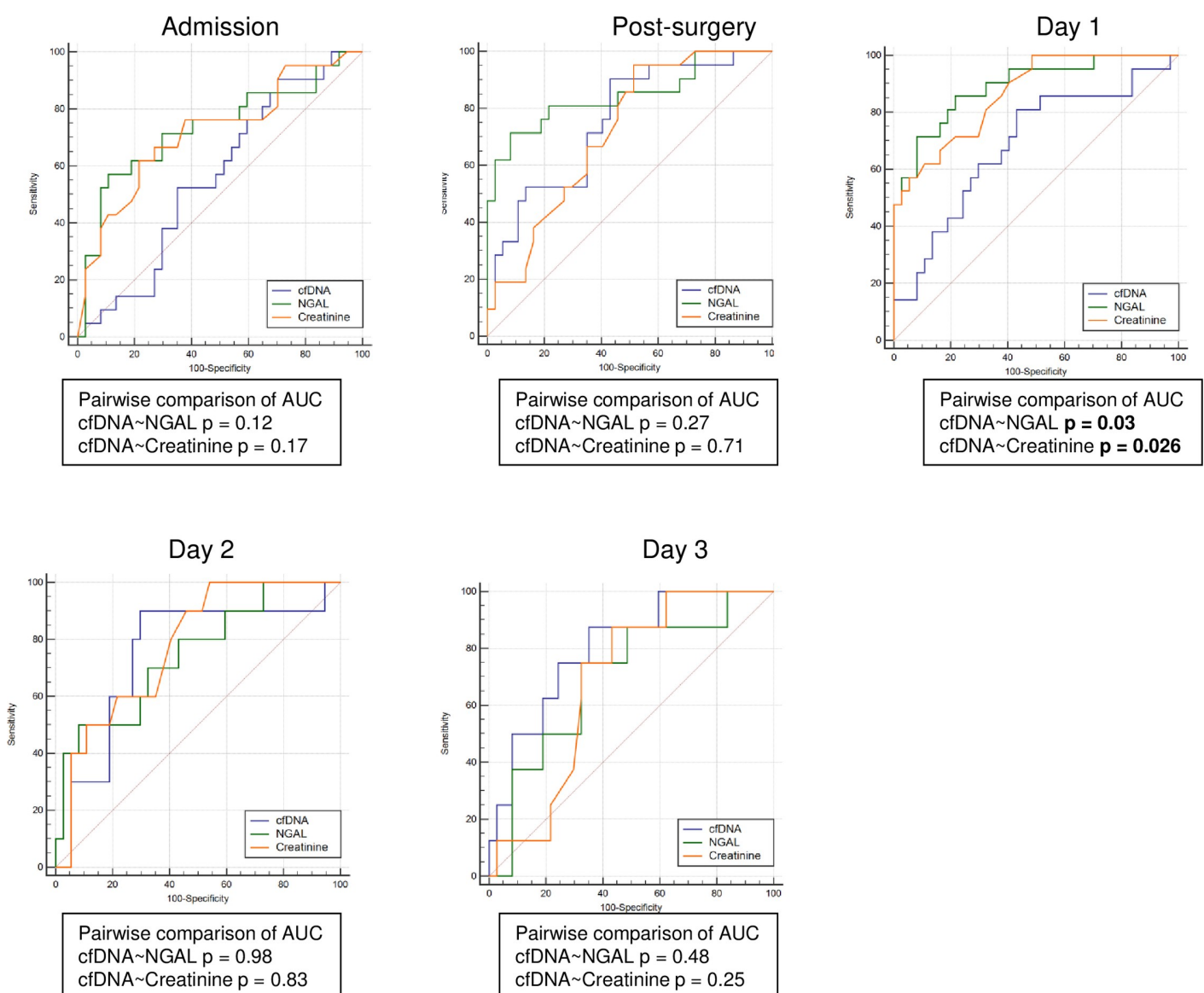


Fig 2. ROC curves. ROC curves at admission, post-surgery, day 1, day 2 and day 3 for AKI prediction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.g002>

with postsurgical AKI [24–26]. NGAL levels were highly predictive for AKI development at admission, after surgery and at day 1 post-surgery (Table 3). At day 1, a significant reduction in the AUC for cfDNA was found when compared with the AUCs for NGAL and creatinine, respectively. However, with the exception of day 1, the AUCs did not significantly differ. Interestingly, in the further course, the AUCs for cfDNA increased reaching a maximum at day 3 after surgery. At a cut-off value of 269.34 ng/ml at day 2 and 260.53 ng/ml at day 3 highest sensitivity of 90% and 87.5% as well as specificity of 70.3% and 64.9% were determined. Diagnostic odds ratio (DOR) at day 2 and day 3 were highest for cfDNA (21.64 at day 2 and 13.1 at day 3) when compared to NGAL (11.42 at day 2 and 6.24 at day 3). Furthermore, AUCs for creatinine levels were almost continuously lower when compared to the AUCs for NGAL (Table 3).

Association of cfDNA and NGAL with late AKI development

To prove if cfDNA might be associated with AKI at late stages after cardiac surgery, we compared cfDNA and NGAL levels between patients with early and those with late AKI development. Early postoperative AKI was defined as elevation in creatinine levels according to the AKIN criteria during the first 24 hours after surgery, whereas patients displaying increase in creatinine levels at later times were included in the late AKI group. Both, cfDNA and NGAL levels significantly increased after surgery in patients with late AKI development when compared to baseline levels (Fig 3) being in line with the significant positive correlation found between cfDNA and NGAL. At day 1, NGAL levels were significantly higher in patients included in the early AKI group when compared to the levels detected in patients with late AKI. In contrast, cfDNA was only significantly increased in patients with late AKI development. cfDNA levels remained increased until at least postoperative day 5. More importantly, only cfDNA plasma levels, but not NGAL or creatinine, were significantly elevated in AKI patients at day 5 after surgery in comparison to patients with AKI development during the first 24 hours after surgery (early AKI). cfDNA levels in patients who developed AKI at day 5 after surgery showed positive correlation with plasma NGAL (Spearman's Rho 0.76, $p = 0.03$)

Table 3. Diagnostic accuracy of cfDNA, NGAL and creatinine for predicting AKI after on-pump surgery.

	Predictor	AUC	95% CI	p-value	Cut-off	Sensitivity	Specificity	+LR	-LR	DOR
Admission	cfDNA	0.561	0.425–0.691	0.426	132.21	90.48	29.37	1.29	0.32	4.03
	NGAL	0.732	0.6–0.84	0,0019	116,28	57,1	89,2	5.29	0.48	11.02
	Creatinine	0.718	0.585–0.828	0,003	0,99	61,9	78,4	2.86	0.49	5.83
Post-surgery	cfDNA	0.754	0.623–0.858	0,0001	211,94	90,5	56,8	2.09	0.17	12.29
	NGAL	0.846	0.727–0.927	<0,0001	226,98	71,43	91,9	8.81	0.31	28.41
	Creatinine	0.719	0.585	0,001	0,77	95,2	48,65	1.85	0.098	18.87
Day 1	cfDNA	0.686	0.551–0.8	0,013	267,69	80,95	56,76	1.87	0.34	5.5
	NGAL	0.891	0.781–0.957	<0,0001	115,87	85,71	78,38	3.96	0.18	22
	Creatinine	0.866	0.75–0.94	<0,0001	1.09	57.14	94.59	10.57	0.45	23.48
Day 2	cfDNA	0.749	0.601–0.864	0,0087	269,34	90	70,3	3.03	0.14	21.64
	NGAL	0.746	0.598–0.862	0,0075	146,1	50	91,9	6.17	0.54	11.42
	Creatinine	0.776	0.63–0.884	0,0002	0,79	100	45,9	1.85	0	
Day 3	cfDNA	0.804	0.659–0.907	0,0002	260,53	87,5	64,9	2.49	0.19	13.1
	NGAL	0.699	0.544–0.827	0,056	95,79	75	67,6	2.31	0.37	6.24
	Creatinine	0.688	0.532–0.817	0,027	0,86	87,5	56,8	2.02	0.22	9.18

AKI, acute kidney injury; AUC, area under curve; cfDNA, cell-free DNA; CI, confidence interval; DOR, diagnostic odds ratio; LR, likelihood ratio; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.t003>

and creatinine (Spearman's Rho 0.82, $p = 0.03$). However no correlations were found in patients of the early AKI group nor in patients with late AKI development.

Association of cfDNA and NGAL with the severity of AKI and mortality

To further elaborate if plasma cfDNA might be associated with disease severity or mortality, respectively, we first compared all cfDNA concentrations determined in patients with stage 1 AKI with the concentrations found in stage 2 AKI patients (Fig 4A). No intergroup differences could be found. In contrast, patients who developed stage 2 AKI had significantly higher levels of circulating NGAL compared to patients with stage 1 AKI. By performing ROC curve analysis, NGAL was found to be a good predictor for stage 2 AKI (Cut-off 271.03 ng/ml, AUC = 0.784) among patients with kidney injury. Similarly NGAL, but not cfDNA, was significantly higher in patients who did not survive after cardiac surgery (Fig 4B). AUC for NGAL was 0.762 and significantly higher than the AUC for cfDNA (AUC = 0.550). Thus, high NGAL levels might indicate more severe kidney injury. Additionally, NGAL levels can be used to predict mortality of patients who develop AKI during the first 5 days after cardiac surgery.

Univariate analysis

By performing univariate regression analysis, significant prediction for postoperative occurrence of AKI on basis of cfDNA for values greater than threshold was found for hyperlipidemia at surgery day odds ratio = 12.00 [1.13–107] (Table 4). We also found that on the basis of

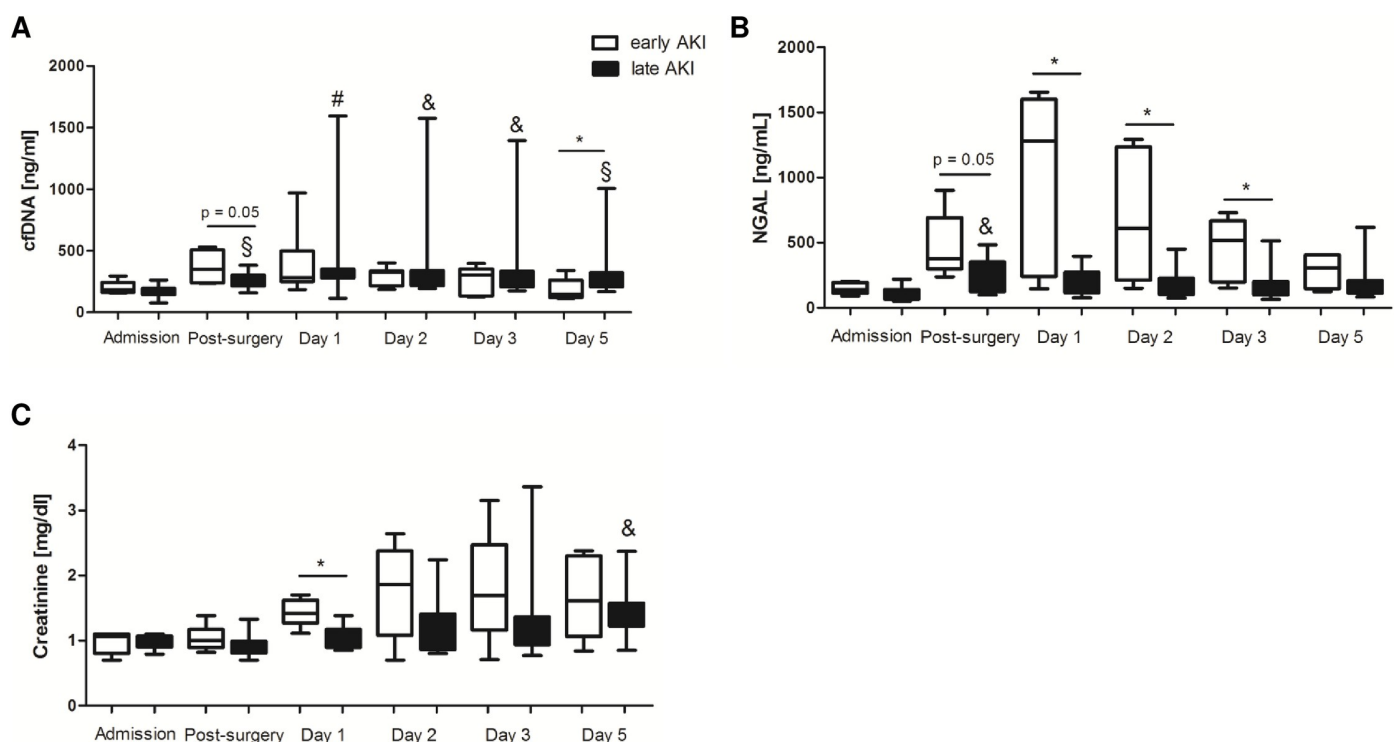


Fig 3. Kinetics of cfDNA/NETs, NGAL and creatinine in patients with early and late postoperative AKI development. AKI patients were divided into those with diagnosed AKI during the first 24 hours after surgery (early AKI) and those with AKI development at later times (late AKI). cfDNA (A), NGAL (B) and creatinine (C) concentrations were quantified at the defined times. & $p < 0.05$, \$ $p < 0.01$, # $p < 0.001$ vs. admission; * $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.g003>

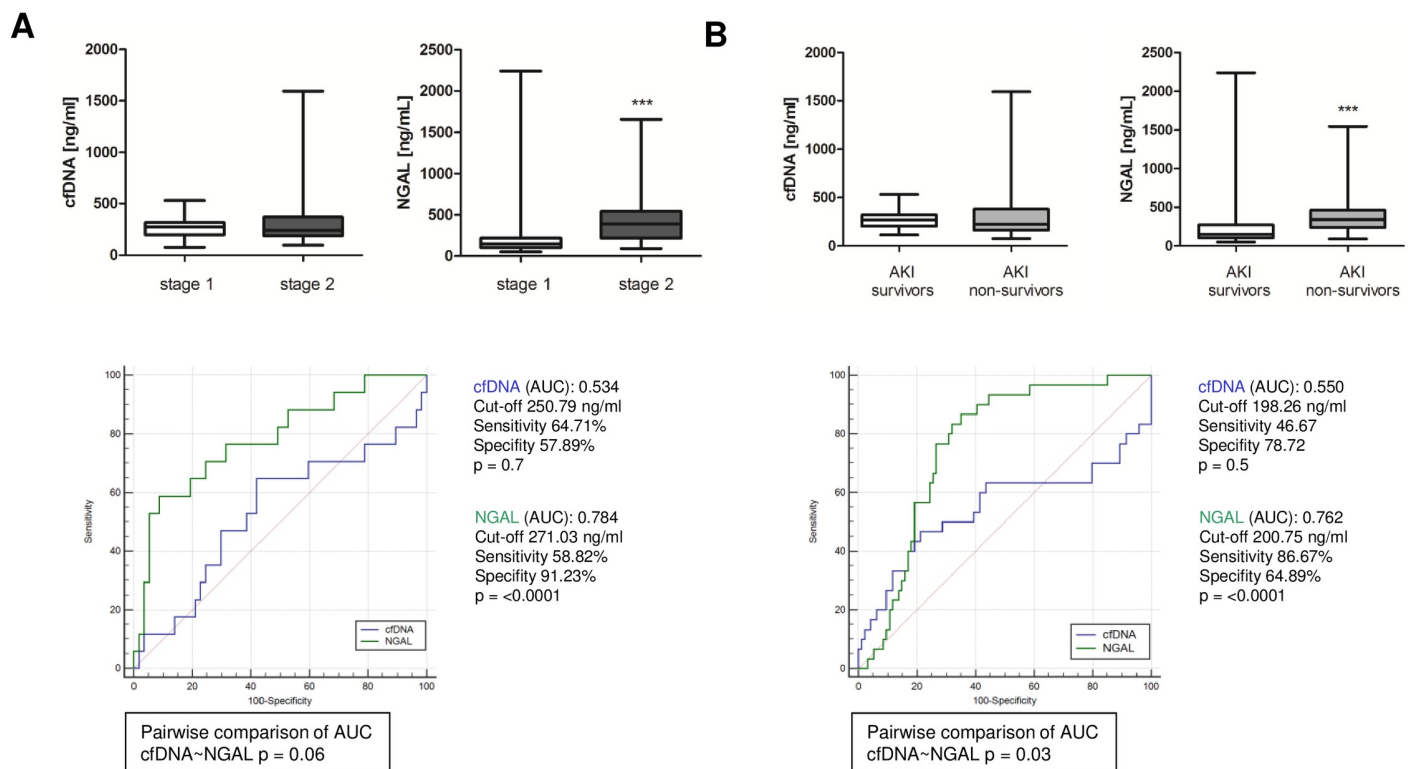


Fig 4. Association of disease severity and mortality with cfDNA and NGAL. (A) cfDNA and NGAL were compared between patients with stage 1 (n = 14) and stage 2 (n = 7) AKI. Receiver operating characteristic curves were performed for the prediction of stage 2 AKI. (B) cfDNA and NGAL levels in patients in survivors and patients who died during 1-year follow-up. Receiver operating characteristic curves were performed for the prediction of mortality in AKI patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.g004>

NGAL (> threshold value), surgery duration, bypass time, cross-clamping time and ICU stay at surgery day, day 1 and day 2 were significantly associated with AKI. At the third postoperative day, bypass and cross-clamping time, ICU stay and hyperlipidemia were independent AKI predictors (Table 5).

Table 4. Predictors for postoperative occurrence of AKI. Odds ratios refer to cfDNA values greater than threshold for AKI development.

Variables	cfDNA at admission	cfDNA at OP day	cfDNA at day 1	cfDNA at day 2	cfDNA at day 3
Surgery duration (h) ^b	0.85 (0.25–2.95)	1.77 (0.60–5.24)	1.48 (0.51–4.30)	0.76 (0.26–2.22)	0.94 (0.33–2.68)
Bypass time (min) ^b	1.50 (0.40–5.62)	2.39 (0.76–7.49)	1.40 (0.47–4.16)	1.09 (0.37–3.21)	1.04 (0.36–3.03)
Cross-clamping time (min) ^b	0.75 (0.22–2.59)	1.38 (0.48–3.96)	1.18 (0.42–3.37)	0.97 (0.34–2.78)	0.86 (0.30–2.42)
ICU stay (d) ^b	1.35 (0.32–5.73)	0.79 (0.25–2.54)	0.87 (0.27–2.80)	1.80 (0.56–5.77)	0.94 (0.30–3.00)
Ventilation time (h) ^b	0.86 (0.82–9.00)	1.59 (0.12–10.08)	2.23 (0.22–22.80)	5.10 (0.50–52.40)	0.39 (0.38–3.96)
Hyperlipidemia	6.22 (1.18–32.76) ^a	12.00 (1.13–107) ^a	4.31 (0.89–11.48)	4.55 (0.51–40.60)	1.010 (0.22–5.40)

^a significant predictors in univariate analysis.

^b value > mean. Odds Ratio with 95% confidence interval (CI); cfDNA cell-free DNA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.t004>

Discussion

AKI after cardiac surgery is a widespread and serious postoperative complication that is closely associated with a higher risk of early and also late mortality. During the last decades, many studies have been conducted to identify new serum and urinary biomarkers of kidney injury to improve AKI diagnosis [27–29].

Use of CPB during cardiac surgery triggers release of cfDNA/NETs and significant increase of cfDNA/NETs immediately after on-pump surgery has recently been reported by our group and others [20, 30]. Similar kinetics were previously reported in patients with multiple trauma and sepsis [19] and cfDNA has been proposed as a prognostic tool for mortality in severely injured patients [31]. Use of CPB induces systemic inflammation leading to the activation of neutrophils and NETs formation culminating in endothelial and organ damage, e.g. AKI. Additionally, cfDNA might become released by damaged cells and amplify inflammation by the activation of TLR9 receptor [32, 33]. Other proinflammatory mechanisms mediated by circulating cfDNA/NETs comprise tubular cell necrosis and renal inflammation by the interaction of histones and TLR-2 and TLR-4 [34]. Here, we found cfDNA/NETs to strongly increase after cardiac surgery and, in contrast to previously published data [35], significant differences regarding plasma cfDNA concentrations between patients with and without AKI development were found until day 3 after surgery. However, cfDNA levels did not correlate with disease severity or mortality and its prognostic value for AKI was found to increase when surgery-triggered acute inflammation subsides. A very recent published report describes that ischemia/reperfusion injury induces NETs formation in the kidney yielding in higher levels of circulating cfDNA. The same group also demonstrated that NETs degradation or inhibition of NETs formation is sufficient to ameliorate kidney injury [36]. As mentioned above, these findings cannot be supported by our data. The discrepancies between the studies might be explained by the fact that in cardiac surgery, cfDNA does not seem to solely indicate kidney injury but rather is more likely to reflect the systemic inflammation. This assumption is assured by the finding that cfDNA levels significantly increased in both patients groups, e.g. in patients with and without AKI development. Rather, cfDNA levels were also found to depend on the time of CPB support, largely in part due to massive neutrophil activation by the extracorporeal circuit and subsequent NETs release [20].

In fact, by comparing cfDNA with plasma NGAL, NGAL was found to be a reliable and sensitive biomarker to predict AKI at a very early stage after surgery. In line with the study of Perrotti *et al.*, NGAL levels at admission and also at day 1 after surgery accurately predicted AKI development [6], whereas at later times, i.e. >24 hours, the AUC values started to decline. However, as stage 2 AKI was diagnosed at day 1 and day 2 after surgery, respectively, NGAL levels were also highly predictive for disease severity and mortality. These findings are in line with the data presented by Bennett and co-workers who demonstrated that NGAL is an early predictive biomarker of AKI severity after CPB [37].

While changes of creatinine levels have been described to occur late in the development of AKI, there is some evidence for a rise in serum creatinine to accurately predict AKI after cardiac surgery [24]. In accordance to previous reports [25, 26, 38], demonstrating that assessment of serum creatinine has a good predictive value for cardiac surgery-associated AKI, our data suggest that serum creatinine is strongly associated with AKI development after cardiac surgery as reliably as NGAL. In fact, except for day 1, no significant differences between AUC values of cfDNA, NGAL and creatinine were found. However, use of serum creatinine in cardiac surgery with CPB should be treated with caution as creatinine levels might be unreliable. On the one hand, creatinine levels become modulated by hypothermia muscle damage during surgery. On the other hand, creatinine concentrations determined post-surgery do not really

Table 5. Predictors for postoperative occurrence of AKI. Odds ratios refer to NGAL values greater than threshold for AKI development.

Variables	NGAL at admission	NGAL at OP day	NGAL at day 1	NGAL at day 2	NGAL at day 3
Surgery duration (h) ^b	4.40 (1.28–15.15) ^a	4.88 (1.49–15.90) ^a	3.56 (1.19–10.59) ^a	5.73 (1.75–18.75) ^a	2.88 (0.97–8.56)
Bypass time (min) ^b	2.87 (0.88–9.38)	10.85 (3.01–39.15) ^a	8.84 (2.57–30.41) ^a	8.75 (2.54–30.06) ^a	5.34 (1.61–17.76) ^a
Crossclamping time (min) ^b	7.80 (1.91–31.79) ^a	7.50 (2.07–27.20) ^a	8.21 (2.53–26.68) ^a	8.67 (2.38–31.54) ^a	3.17 (1.08–9.31) ^a
ICU stay (d) ^b	4.25 (1.22–14.78) ^a	6.11 (1.75–21.37) ^a	5.40 (1.48–19.73) ^a	12.75 (3.24–50.12) ^a	10.29 (2.07–51.22) ^a
Ventilation time (h) ^b	9.46 (0.91–98.97)				
Hyperlipidemia	0.95 (0.16–5.45)	3.27 (0.37–29.35)	1.19 (0.24–5.84)	0.67 (0.13–3.32)	0.84 (0.17–4.16) ^a

^a significant predictors in univariate analysis.^b value > mean. Odds Ratio with 95% confidence interval (CI); NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218548.t005>

reflect the in vivo concentration and are usually lower because of patients' volume therapy and hemodilution [39].

More interestingly, we show here for the first time, that cfDNA/NETs but not NGAL or creatinine represent valuable AKI predictors at late stage after cardiac surgery. Indeed, patients with AKI development >24 hours after surgery, displayed a more pronounced rise in cfDNA after surgery compared to patients with early AKI development during the first 24 hours, and significant intergroup differences were found at day 5. Of note, neither NGAL nor creatinine showed a similar course, and both biomarkers were found to be significantly higher in patients with early AKI. In patients with AKI development at postoperative day 5, for the day 3 cfDNA quantification, the AUC was 0.804 and the diagnostic odds ratio for AKI prediction was 13.1 using a cut-off value of 260.53 ng/ml. In turn, AUCs for NGAL and creatinine (0.699 and 0.688) as well as diagnostic odds ratios of 6.24 and 9.18 were lower.

The underlying mechanisms could not be determined by the current study design. Also the source of cfDNA in patients with late AKI was not closer identified. We assume that plasma cfDNA at early stages after surgery originates from necrotic tissue and hyperactivated neutrophils and largely reflects systemic inflammation. Conversely, when surgery-associated inflammation starts to subside, cfDNA probably originating from necrotic tubular epithelial cells, functions to a great extent as a biomarker for kidney injury. Indeed, levels for neutrophil elastase, IL-6 and TNF- α in patients undergoing cardiac surgery have been demonstrated to peak during the first hours after surgery and visibly declined until the fourth postoperative day [40]. AKI development on day 5 after surgery might rather be a consequence of postoperative patient management such as exposure to nephrotoxic drugs. In this regard, combined administration of ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, diuretics, or nonsteroidal anti-inflammatory drugs, as part of postoperative management, were found to be associated with increased risk of AKI [41, 42]. However, early and exact detection of AKI is critical in clinical practice and would ensure clinical interventions, such as avoidance of hypovolemia or aggressive diuresis which might contribute to the reduction of renal damage. Thus, it is likely, that timely diagnosis on the basis of early biomarkers, e.g. NGAL, could be efficient in limiting kidney injury progression and subsequent rise in cfDNA.

It should be also mentioned, that in patients with post-surgical AKI development NGAL and creatinine were already significantly increased at the time of admission, probably due to stronger inflammation in these patients, although levels of CRP were not elevated (unpublished

results). Thus, it might be assumed that patients with higher inflammation or consisting signs of kidney injury, already preoperatively, are more prone for postsurgical complication, e.g. AKI. Indeed, both NGAL and creatinine expression are influenced by comorbidities [43, 44]. Additionally, despite the limited patient number included in this study, our results strongly support previously published data demonstrating increased mid-term / long-term mortality in patients with AKI after cardiac surgery [45, 46].

However, there are also some limitations of this study. First, data have been collected from a single center with a non-blinded design with a limited number of patients. Our AKI diagnosis is solely based on serum creatinine and we did not consider changes in urinary biomarkers. Previous studies identified urinary IL-18 and NGAL, among others, as early predictive markers for AKI after CPB [29, 47]. Taking into account that volume overload might falsify serum creatinine, this may represent a further limitation of this study.

Further large-scale analyses will be needed to illustrate the relationship between plasma cfDNA and postoperative AKI development after on-pump surgery and to straighten its feasibility as an AKI biomarker. Nevertheless, cfDNA should be considered as a feasible biomarker to predict AKI in cardiac surgical patients.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Pawis Rahmanian from the Department of Cardiothoracic Surgery, Heart Center, Cologne for careful revision of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Antje C. Deppe, Adnana Paunel-Görgülü.

Data curation: Aldo Daka.

Formal analysis: Julia Merkle.

Funding acquisition: Thorsten Wahlers.

Investigation: Aldo Daka.

Project administration: Antje C. Deppe.

Supervision: Julia Merkle, Adnana Paunel-Görgülü.

Validation: Julia Merkle, Thorsten Wahlers, Adnana Paunel-Görgülü.

Writing – original draft: Adnana Paunel-Görgülü.

Writing – review & editing: Aldo Daka, Thorsten Wahlers.

References

1. Hobson CE, Yavas S, Segal MS, Schold JD, Tribble CG, Layon AJ, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation*. 2009; 119(18):2444–53. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.800011> PMID: 19398670.
2. Bove T, Calabro MG, Landoni G, Aletti G, Marino G, Crescenzi G, et al. The incidence and risk of acute renal failure after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004; 18(4):442–5. PMID: 15365924.
3. Roh GU, Lee JW, Nam SB, Lee J, Choi JR, Shim YH. Incidence and risk factors of acute kidney injury after thoracic aortic surgery for acute dissection. *Ann Thorac Surg*. 2012; 94(3):766–71. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.04.057> PMID: 22727320.
4. Kumar AB, Suneja M, Bayman EO, Weide GD, Tarasi M. Association between postoperative acute kidney injury and duration of cardiopulmonary bypass: a meta-analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012; 26(1):64–9. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2011.07.007> PMID: 21924633.

5. Arora P, Kolli H, Nainani N, Nader N, Lohr J. Preventable risk factors for acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012; 26(4):687–97. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2012.03.001> PMID: 22516466.
6. Perrotti A, Miltgen G, Chevet-Noel A, Durst C, Vernerey D, Bardonnet K, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as early predictor of acute kidney injury after cardiac surgery in adults with chronic kidney failure. *Ann Thorac Surg*. 2015; 99(3):864–9. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.10.011> PMID: 25595830.
7. Perry TE, Muehlschlegel JD, Liu KY, Fox AA, Collard CD, Shernan SK, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute postoperative kidney injury in adult cardiac surgical patients. *Anesth Analg*. 2010; 110(6):1541–7. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181da938e> PMID: 20435938; PubMed Central PMCID: PMC2999841.
8. Lin X, Yuan J, Zhao Y, Zha Y. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J Nephrol*. 2015; 28(1):7–16. <https://doi.org/10.1007/s40620-014-0113-9> PMID: 24899123; PubMed Central PMCID: PMC4322238.
9. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. 2014; 86(3):136–42. <https://doi.org/10.4174/astr.2014.86.3.136> PMID: 24761422; PubMed Central PMCID: PMC3994618.
10. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, et al. Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:306580. <https://doi.org/10.1155/2014/306580> PMID: 25045663; PubMed Central PMCID: PMC4090497.
11. Avriel A, Paryente Wiessman M, Almog Y, Perl Y, Novack V, Galante O, et al. Admission cell free DNA levels predict 28-day mortality in patients with severe sepsis in intensive care. *PLoS One*. 2014; 9(6): e100514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100514> PMID: 24955978; PubMed Central PMCID: PMC4067333.
12. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutierrez-Pizarra A, Lopez I, Marquez-Vacaro JA, Macher H, et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care*. 2014; 18(3):R116. <https://doi.org/10.1186/cc13908> PMID: 24903083; PubMed Central PMCID: PMC4229882.
13. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007; 13(4):463–9. <https://doi.org/10.1038/nm1565> PMID: 17384648.
14. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010; 584(14):3193–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.006> PMID: 20541553.
15. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663):1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385> PMID: 15001782.
16. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012; 7(2):e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366> PMID: 22389696; PubMed Central PMCID: PMC3289648.
17. van Montfort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(1):147–51. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300498> PMID: 23104849.
18. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009; 15(6):623–5. <https://doi.org/10.1038/nm.1959> PMID: 19448636; PubMed Central PMCID: PMC2760083.
19. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. 2008; 30(4):352–8. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31816a6bb1> PMID: 18317404.
20. Paunel-Gorgulu A, Wacker M, El Aita M, Hassan S, Schlachtenberger G, Deppe A, et al. cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep*. 2017; 7(1):17421. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17561-1> PMID: 29234042; PubMed Central PMCID: PMC5727170.
21. Likhvantsev VV, Landoni G, Grebenchikov OA, Skripkin YV, Zabelina TS, Zinovkina LA, et al. Nuclear DNA as Predictor of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft: A Pilot

- Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017; 31(6):2080–5. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2017.04.051> PMID: 28967626.
22. Scarscia G, Guida P, Rotunno C, de Luca Tupputi Schinosa L, Paparella D. Anti-inflammatory strategies to reduce acute kidney injury in cardiac surgery patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Artif Organs*. 2014; 38(2):101–12. <https://doi.org/10.1111/aor.12127> PMID: 23876045.
23. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007; 11(2):R31. <https://doi.org/10.1186/cc5713> PMID: 17331245; PubMed Central PMCID: PMC2206446.
24. Grynberg K, Polkinghorne KR, Ford S, Stenning F, Lew TE, Barrett JA, et al. Early serum creatinine accurately predicts acute kidney injury post cardiac surgery. *BMC Nephrol*. 2017; 18(1):93. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0504-y> PMID: 28302078; PubMed Central PMCID: PMC5353965.
25. Ho J, Reslerova M, Gali B, Nickerson PW, Rush DN, Sood MM, et al. Serum creatinine measurement immediately after cardiac surgery and prediction of acute kidney injury. *Am J Kidney Dis*. 2012; 59(2):196–201. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.08.023> PMID: 21967775.
26. De Looer J, Herck I, Francois K, Van Wesemael A, Nuytinck L, Meyer E, et al. Diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: differential roles of creatinine, chitinase 3-like protein 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a prospective cohort study. *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1):24. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0251-z> PMID: 28251598; PubMed Central PMCID: PMC5332341.
27. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr*. 2011; 23(2):194–200. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328343f4dd> PMID: 21252674; PubMed Central PMCID: PMC3257513.
28. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10(1):147–55. <https://doi.org/10.2215/CJN.12191213> PMID: 25092601; PubMed Central PMCID: PMC4284423.
29. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, Dursun B, Ma Q, Kelly C, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int*. 2006; 70(1):199–203. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001527> PMID: 16710348.
30. Qi Y, Uchida T, Yamamoto M, Yamamoto Y, Kido K, Ito H, et al. Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction. *Anesthesiol Res Pract*. 2016; 2016:2794364. <https://doi.org/10.1155/2016/2794364> PMID: 27882047; PubMed Central PMCID: PMC5110877.
31. Gogenur M, Burcharth J, Gogenur I. The role of total cell-free DNA in predicting outcomes among trauma patients in the intensive care unit: a systematic review. *Crit Care*. 2017; 21(1):14. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1578-9> PMID: 28118843; PubMed Central PMCID: PMC5260039.
32. Lindau D, Mussard J, Wagner BJ, Ribon M, Ronnefarth VM, Quettier M, et al. Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur J Immunol*. 2013; 43(8):2101–13. <https://doi.org/10.1002/eji.201142143> PMID: 23686399.
33. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010; 464(7285):104–7. <https://doi.org/10.1038/nature08780> PMID: 20203610; PubMed Central PMCID: PMC2843437.
34. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hagele H, Lichtnekert J, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(8):1375–88. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011111077> PMID: 22677551; PubMed Central PMCID: PMC3402284.
35. Vaara ST, Lakkisto P, Immonen K, Tikkanen I, Ala-Kokko T, Pettila V, et al. Urinary Biomarkers Indicative of Apoptosis and Acute Kidney Injury in the Critically Ill. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0149956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149956> PMID: 26918334; PubMed Central PMCID: PMC4769222.
36. Raup-Konsavage WM, Wang Y, Wang WW, Feliers D, Ruan H, Reeves WB. Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018; 93(2):365–74. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.08.014> PMID: 29061334; PubMed Central PMCID: PMC5794573.
37. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(3):665–73. <https://doi.org/10.2215/CJN.04010907> PMID: 18337554; PubMed Central PMCID: PMC2386703.
38. Zappitelli M, Bernier PL, Saczkowski RS, Tchervenkov CI, Gottesman R, Dancea A, et al. A small post-operative rise in serum creatinine predicts acute kidney injury in children undergoing cardiac surgery. *Kidney Int*. 2009; 76(8):885–92. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.270> PMID: 19641482.
39. Hoste EA, Blot SI, Lameire NH, Vanholder RC, De Bacquer D, Colardyn FA. Effect of nosocomial bloodstream infection on the outcome of critically ill patients with acute renal failure treated with renal replacement therapy. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(2):454–62. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000110182.14608.0c> PMID: 14747393.

40. Parolari A, Camera M, Alamanni F, Naliato M, Polvani GL, Agrifoglio M, et al. Systemic inflammation after on-pump and off-pump coronary bypass surgery: a one-month follow-up. *Ann Thorac Surg*. 2007; 84(3):823–8. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2007.04.048> PMID: 17720383.
41. Dreischulte T, Morales DR, Bell S, Guthrie B. Combined use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with diuretics and/or renin-angiotensin system inhibitors in the community increases the risk of acute kidney injury. *Kidney Int*. 2015; 88(2):396–403. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.101> PMID: 25874600.
42. Lapi F, Azoulay L, Yin H, Nessim SJ, Suissa S. Concurrent use of diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers with non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: nested case-control study. *BMJ*. 2013; 346:e8525. <https://doi.org/10.1136/bmj.e8525> PMID: 23299844; PubMed Central PMCID: PMC3541472.
43. Martensson J, Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif*. 2014; 37(4):304–10. <https://doi.org/10.1159/000364937> PMID: 25170751.
44. Andreev E, Koopman M, Arisz L. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: which drugs can be responsible? *J Intern Med*. 1999; 246(3):247–52. PMID: 10475992.
45. Ferreira A, Lombardi R. Acute kidney injury after cardiac surgery is associated with mid-term but not long-term mortality: A cohort-based study. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0181158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181158> PMID: 28700753; PubMed Central PMCID: PMC5507329.
46. Petaja L, Vaara S, Liuhanen S, Suojäranta-Ylinen R, Mildh L, Nisula S, et al. Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery by Complete KDIGO Criteria Predicts Increased Mortality. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017; 31(3):827–36. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2016.08.026> PMID: 27856153.
47. Moriyama T, Hagihara S, Shiramomo T, Nagaoka M, Iwakawa S, Kanmura Y. Comparison of three early biomarkers for acute kidney injury after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *J Intensive Care*. 2016; 4:41. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0164-1> PMID: 27330813; PubMed Central PMCID: PMC4915135.

4. Diskussion

4.1. Zusammenhang AKI und herzchirurgische Eingriffe

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass von den 58 untersuchten Patienten 21 an einer AKI erkrankten. Von diesen Patienten erlitten sieben Patienten eine AKI in den ersten 24 postoperativen Stunden und zehn Patienten erst ab dem dritten postoperativen Tag. 14 Patienten erlitten eine AKI im Stadium 1, das restliche Drittel der AKI-Gruppe erkrankte somit an einer AKI Stadium 2 oder höher. Insgesamt starben 5 Patienten, alle aus der AKI-Gruppe. 2i davon starben innerhalb der ersten beiden Wochen postoperativ, die anderen 3 starben innerhalb von vier Monaten postoperativ. Todesursachen waren unter anderem Herzversagen, Schlaganfall und Blutungsereignisse.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die cfDNA-Spiegel bei den Patienten, welche erst nach über 24 Stunden eine AKI entwickelten, schon am ersten postoperativen Tag, besonders aber am dritten postoperativen Tag, signifikant erhöht waren, sodass sich hier eine mögliche frühzeitige Diagnostik ableiten ließ. Die NGAL- und Kreatininspiegel waren hingegen erst unmittelbar mit Auftreten einer AKI erhöht, sodass mittels dieser Parameter keine Früherkennung möglich war.

Auffällig war, dass Patienten der AKI-Gruppe eine signifikant längere Operationsdauer mit verlängerter Herzlungenmaschinen- und Aortenklammzeit hatten. Wie im Abschnitt 2.2. bereits beschrieben, wird AKI maßgeblich durch Inflamationsprozesse begünstigt. Der Einsatz einer Herzlungenmaschine und eine lange Aortenklammzeit werden mit einer verstärkten inflammatorischen Reaktion in Verbindung gebracht ¹⁰⁹.

Die Pathophysiologie von AKI nach Herzoperationen ist bei einer multifaktoriellen und komplexen immunologischen Genese in Teilen noch unverstanden. Eine AKI stellt nach Herzoperationen eine sehr häufige sowie schwerwiegende Komplikation dar. In ca. 1-5 % der Fälle besteht sogar eine dauerhafte Dialysepflichtigkeit als Komplikation und Folge einer AKI ¹¹⁰. Somit ist auch die Mortalität und Morbidität nach einer herzchirurgischen Operation eng damit verbunden ¹¹⁰.

Durch die Verwendung Herzlungenmaschine kommt es zur Minderperfusion und folgend auch Ischämie der Nieren. Dies entsteht durch eine Änderung des Tonus der Gefäßmuskulatur, wodurch es zu einer gestörten Autoregulation der Niere mit konsekutiver Minderdurchblutung und einer Verringerung des Sauerstoffpartialdrucks im Nierenparenchym kommt. Der Nierenperusionsdruck kann um bis zu 30 % abfallen, wodurch ebenfalls die Ischämie-Reperfusionsschädigung erhöht wird ¹¹¹.

Es ist anzumerken, dass es derzeit wenige Interventionsmöglichkeiten im Falle eines frühen Erkennens der AKI gibt. Die klinische Behandlung bliebe trotz Früherkennung nach aktuellem

Forschungsstand eine besondere Herausforderung, da aufgrund der komplexen Genese kaum gezielt interveniert werden kann.

Auch ist zu bedenken, dass es sich bei herzchirurgischen Patienten oft um chronisch kranke Patienten handelt, bei welchen bereits seit langer Zeit immunologische Prozesse durch Vorerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, Herzinsuffizienz) aktiv sind und die Immunmodulation möglicherweise schon von vornherein verändert ist. Dadurch kann es unter Umständen zu einer schlechteren Vergleichbarkeit mit der Allgemeinbevölkerung bzw. zu einer unklaren Aussagekraft von Immunmarkern wie cfDNA/NETs kommen.

Am Beispiel eines vorliegenden Diabetes Mellitus wurde in einer Studie aus dem Jahr 2024 das Risiko der Entwicklung einer AKI nach on-pump Operationen bei akuter Hyperglykämie untersucht. Hier war bereits bei einem intraoperativen Blutzuckerwert >128 mg/dl das Risiko der Entwicklung einer postoperativen AKI erhöht ¹¹². Eine andere Studie zeigte, dass auch eine präoperative Anämie einen erheblichen Risikofaktor für eine postoperative AKI darstellt, am ehesten bedingt durch die damit einhergehende zelluläre Hypoxie ¹¹³.

4.2. cfDNA als Biomarker

CfDNA ist freiliegende DNA ohne Zellkern, welche von untergehenden Zellen freigesetzt werden kann, aber auch von fetaler DNA, selbstaktiver DNA (z.B. durch Trauma oder Infektionen) und von Tumorzellen ^{114 115}. Auch wird vermutet, dass es immer mehrere dieser ursächlichen Quellen beteiligt sind, wenn cfDNA vermehrt auftritt ¹¹⁴. Sie kommt auch im Blut von Gesunden vor. Hier wird angenommen, dass sie größtenteils aus hämatopoetischen Zellen stammt und an Proteine gebunden vorliegt. Die cfDNA-Spiegel im Gesunden sind niedrig ¹¹⁴.

Ihr diagnostischer Nutzen ist vielfältig und reicht von pränatalen und genetischen Tests bis zur Tumorerkennung und Therapiemonitoring ¹¹⁴.

Im Falle einer AKI scheint die Pathophysiologie zu sein, dass durch cfDNA im Interstitium der Tubuli sowohl Thrombozyten freigesetzt, als auch NETs freigesetzt werden, welche wiederum miteinander interagieren und so den Inflamationsprozess in der Niere aggravieren ³⁶.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen meiner Studie, dass bei allen Patienten nach Herzoperationen die cfDNA/NETs-Spiegel zunahmen. Es gelang in dieser Arbeit erstmals, signifikante Unterschiede in den Plasmakonzentrationen zwischen AKI und nicht-AKI Patienten bis zum dritten postoperativen Tag zu messen.

Jedoch konnte kein linearer Zusammenhang zwischen der Schwere der AKI und Höhe der cfDNA-Spiegel festgestellt werden. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten werden vonnöten sein, um in diesem Kontext die Zusammenhänge genauer darstellen zu können. Aufgrund der Erkenntnisse anderer Studien, welche sich ebenfalls mit der Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung auseinandersetzen, liegt jedoch der Verdacht

nahe, dass geringe cfDNA-Spiegel und damit einhergehend eine geringere Anzahl von NETs stellvertretend für eine geringere Inflamationsreaktion stehen und so der Zellschaden (und somit auch der Endorganschaden) geringer ausfällt ^{116 36 117}.

Die Ergebnisse dieser Studien beziehen sich jedoch vorwiegend auf Studien bei ischämischem Niereninsult. Jedoch ist es denkbar, dass sich die Pathophysiologie auch auf postoperative AKI übertragen lässt. Auch hier werden weitere Studien gebraucht werden, um einen direkten Vergleich herstellen zu können.

Es tragen noch weitere Faktoren wie beispielsweise oxidativer Stress zur Nierenschädigung bei. Dieser kann durch cfDNA und die dadurch getriggerten Signalwege verstärkt werden. Es kommt zur oxidativen Degradation von Lipiden und Denaturierung von Proteinen ³³. Durch die Ischämie- / Reperfusionsschädigung kommt es zur vermehrten Ausschüttung von NETs/cfDNA in der Niere. Dies wurde auch in einer Mausstudie gezeigt. Außerdem wurde hier beobachtet, dass eine Zerlegung der NETs-Struktur oder die Hemmung dieser eine Nierenschädigung lindern kann ¹¹⁸. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte auch nach Einsatz einer Herzlungenmaschine möglich sein. Diese Erkenntnisse konnten jedoch nicht durch die Daten meiner Studie belegt werden, da in meinen Ergebnissen die Höhe der cfDNA-Spiegel nicht mit der Schwere der AKI korrelierte. Dieser Widerspruch kann einerseits durch die niedrige Studienteilnehmerzahl bedingt sein, andererseits auch durch Unterschiede im Studiensetting (Mausstudie, nicht nach Herzoperation). Es gibt derzeit einige Arbeiten, die sich mit der Elimination von cfDNA und anderen Stressoren aus dem Blut auseinandersetzen, um so den dadurch verursachten Organschaden zu minimieren^{119,120}. Interessant wäre somit ein Vergleich, bei welchem untersucht wird, ob die Höhe der cfDNA-Spiegel mit der Prognose in Zusammenhang steht und ob eine nachträgliche Elimination selbiger einen Effekt auf das Outcome im Vergleich zu Patienten ohne AKI hat.

Aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes konnte auch keine Aussage über die Prognose im Zusammenhang mit erhöhten cfDNA-Spiegeln bezüglich einer spontanen Besserung der Nierenfunktion bzw. zur Wahrscheinlichkeit einer fortschreitenden Nierenerkrankung bis hin zur dauerhaften Dialysepflichtigkeit gemacht werden. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass eine Hämodialyse selbst ebenfalls eine Erhöhung der cfDNA-Spiegel verursachen kann ¹²¹. Zusätzlich wird die Höhe dieser Werte mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ¹²¹. Somit kann es eine Herausforderung sein, Ursache und Wirkung von cfDNA auf die Prognose der Dialysepflichtigkeit zu erheben.

4.3. Vergleich der cfDNA zu NGAL und Kreatinin

Kreatinin ist der gebräuchlichste klinische Biomarker zur Beurteilung der Nierenfunktion. Es hat aber, wie bereits in Punkt 2.7.2 beschrieben, den Nachteil, erst mit einer gewissen Latenz nach einem Insult und bereits eingetretenem Funktionsverlust der Niere als Biomarker zu

fungieren. Einerseits wird der Kreatininspiegel durch Muskelschäden während der intraoperativen Unterkühlung moduliert. Andererseits spiegeln die nach der Operation ermittelten Kreatininkonzentrationen nicht die in vivo Konzentration wider und sind in der Regel aufgrund der Volumentherapie und Hämodilution des Patienten niedriger ¹²².

Aufgrund der Datenlage ^{123 124 125} entschied ich mich trotzdem für Kreatinin als Vergleichsgröße. Optional gibt es zahlreiche Studien zu alternativen Markern wie zum Beispiel NGAL. NGAL ist ein Protein, welches von diversen Epithelzellen und auch Leukozyten exprimiert wird und mit Oberflächenrezeptoren interagiert ^{126 127}.

Studien haben gezeigt, dass der NGAL-Spiegel im Serum, vor allem aber im Urin, schon kurz nach Ischämie, Trauma oder Sepsis ansteigt und präzise ein akutes Nierenversagen anzeigen kann, noch bevor dies mittels Kreatinin möglich ist ¹²⁶. Dabei korrelierte auch die Höhe des gemessenen NGAL-Spiegels mit dem Grad der Organschädigung ^{126 128}.

Auch bei Patienten nach Herzoperationen konnte nachgewiesen werden, dass bei den Patienten mit AKI der NGAL-Spiegel im Urin im Gegensatz zu Patienten ohne AKI schnell anstieg und auch über viele Stunden persistierte ¹²⁹. Auch in meiner Studie konnte durch den Vergleich von cfDNA mit Plasma-NGAL festgestellt werden, dass NGAL einen zuverlässigen und sensitiven Biomarker zur Vorhersage einer AKI in einem frühen Stadium nach der Operation darstellt. Hier wurde NGAL lediglich aus dem Serum gemessen, sodass sich die Frage stellt, ob durch eine Messung im Urin auch zu späteren Zeitpunkten (also ab dem zweiten postoperativen Tag) eine AKI hätte zuverlässiger detektiert werden können.

Verglichen mit den Plasmaspiegeln von cfDNA konnte in meiner Studie gezeigt werden, dass hohe cfDNA -Spiegel bei Patienten gemessen wurden, welche erst am dritten postoperativen Tag oder später eine AKI entwickelten. In der Statistik zeigt sich, dass die AUC für den dritten postoperativen Tag für cfDNA (bezogen auf die Entwicklung einer AKI am fünften postoperativen Tag) bei 0,804 lag, wohingegen sie für Kreatinin und NGAL nur bei 0,688 bzw. 0,699 war. Dies bedeutet, dass cfDNA als frühzeitiger und verlässlicherer Biomarker für die späte AKI Entwicklung genutzt werden könnte. Aufgrund der niedrigen Fallzahl werden jedoch noch weitere Studien benötigt, um die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit dieser Aussage zu verifizieren.

Auch ist hierbei nicht abgebildet, aus welchen Zellen cfDNA sezerniert wurde und ob noch andere Ursachen für die Entstehung einer AKI infrage kommen, wie zum Beispiel der Einsatz potentiell nephrotoxischer Substanzen wie ACE-Hemmer, NSAR oder Diuretika.

Auch ist nicht beschrieben, ob möglicherweise eine Hypovolämie oder eine von vorneherein eingeschränkte Nierendurchblutung aufgrund einer arteriellen Verschlusskrankheit vorlagen. Gerade bei Bypassoperationen mit der Indikation einer ausgeprägten koronaren Herzkrankheit kann von einer generalisierten arteriellen Verschlusskrankheit ausgegangen werden, sodass

auch schon kurze Phasen der Hypotonie oder eben auch Hypovolämie zu einer sekundären Organminderperfusion führen können.

Aktuellere Studien zeigten auch, dass ein Zusammenhang zwischen intravaskulärer NETose bzw. cfDNA und der Bildung von Mikrothrombosen oder COVID-19-assoziiertter AKI besteht¹³⁰. Außerdem berichtete eine weitere Studie, dass signifikant erhöhte cfDNA-Spiegel bei Patienten gemessen werden konnten, die nach einer mit Sepsis-assoziiertter AKI dialysepflichtig wurden¹³¹. Denkbar wäre also auch die Entwicklung einer Sepsis oder SIRS (systemic inflammatory response syndrome) als Ursache für einen späteren Rückgang der Nierenfunktion.

Auch die bereits bestehenden Vorerkrankungen können die NGAL- und die Kreatinin-Expression verändern^{132 133}. Passend dazu war der NGAL-Spiegel in meiner Studie bei einem Teil der Patienten der AKI-Gruppe bereits präoperativ erhöht. Dies könnte durch bereits präoperativ bestehende Inflamationsprozesse bedingt sein (ohne CRP-Erhöhung). Ob und inwiefern NGAL eine bereits präoperativ bestehende Nierenschädigung bzw. Prädisposition für Nierenschädigung anzeigen kann, bleibt Gegenstand der Forschung.

Trotz der Limitationen könnte cfDNA ein vielversprechendes Werkzeug sein, um gefährdete Patienten rechtzeitig zu erkennen und präventiv beispielsweise die Verordnung potentiell nephrotoxischer Medikation zu reduzieren.

4.4. Limitationen der Studie

Einige Limitationen meiner Studie waren:

Die Anzahl der Studienteilnehmer war wie bereits oben erwähnt gering. Es wurden von nur einem einzelnen Zentrum Daten erhoben. Die Studienteilnehmer waren alle eurasischer Herkunft und somit stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse auch auf andere ethnische Gruppen übertragbar sind.

In der vorliegenden Studie erfolgte auch keine Unterteilung nach Ursachen für die AKI (prä-intra- und postrenal). Jedoch sei hier erwähnt, dass eine postrenale Genese klinischerseits auszuschließen ist. Das Fehlen der genauen Unterteilung nach Ursache stellt eine Limitation dieser Studie dar.

Eine weitere Limitation der Studie stellt der kurze Beobachtungszeitraum dar. Dies betrifft vor allem die fehlenden Daten über die späteren Krankheitsverläufe mit gegebenenfalls resultierender chronischer Niereninsuffizienz oder gar dauerhafter Dialysepflichtigkeit.

Es konnte in vorliegender Studie keine Rücksicht auf die Urinausscheidung genommen werden, da dies im Zusammenhang mit der direkten postoperativen Versorgung auf ICU und einem Wechsel des Versorgungsteams zu Ungenauigkeiten führte. Auch erfolgte die Erfassung der Urinmenge rein handschriftlich und war entweder nicht zuverlässig einsehbar

oder nicht plausibel. Somit hätte die unvollständige oder falsche Erfassung der Werte zu einer irreführenden Statistik der Daten geführt.

Jedoch haben frühere Studien bereits gezeigt, dass unter Berücksichtigung der Urinausscheidung eine höhere Inzidenz der AKI Diagnose im Stadium ≥ 2 vorlag^{134 135}. Es zeigte sich außerdem, dass die Sterblichkeit auf der Intensivstation, wenn das Kriterium der Urinausscheidung in die Definition der AKI einbezogen wurde¹³⁵, zuverlässiger vorausgesagt werden konnte, somit ist das Fehlen dieser Erfassung als eine große Limitation meiner Studie anzusehen.

Die AKI-Diagnostik basierte ausschließlich auf Kreatinin im Serum. Die Urinausscheidung wurde nicht berücksichtigt und hätte unter Umständen den Zeitpunkt der AKI-Diagnose beeinflusst. Auch hätten Biomarker (IL-18, NGAL)^{126 136 137} im Urin untersucht werden können. Da Kreatinin als Goldstandard für die AKI-Diagnose verwendet wurde, ist zu bedenken, dass dieses dem Einfluss verschiedener Faktoren wie beispielsweise dem Volumenstatus, der Muskelmasse, dem Geschlecht und dem Alter unterlegen ist¹³⁸.

Außerdem können bereits bestehende inflammatorische Prozesse sowie die Hämolyse ebenfalls zu einer Nierenschädigung führen.

Die Einflüsse der verschiedenen Risikofaktoren wurden in meiner Studie nicht erforscht und sie spielen sicherlich eine wichtige Rolle bei der Schwere der Inflammation. Die Vormedikation der Studienteilnehmer wurde erfasst, jedoch für die Studienergebnisse nicht berücksichtigt.

Ebenfalls bleiben Eliminationswege und Eliminationsdauer der vorhandenen cfDNA unklar. Hier stellt sich die Frage, wie lange diese auch nach Abklingen der Immunreaktion im Blut zirkuliert und ob sie zu jedem gemessenen Zeitpunkt noch eine klinische Relevanz hat und somit als aussagekräftiges Instrument zurate gezogen werden kann.

Weitere größere Studien werden erforderlich sein, um den Zusammenhang zwischen Plasma-cfDNA und postoperativer AKI-Entwicklung nach Herzoperationen zu veranschaulichen und ihre Anwendbarkeit als AKI-Biomarker zu klären.

5. Literaturverzeichnis

1. Bonow RO, Epstein SE. Indications for coronary artery bypass surgery in patients with chronic angina pectoris: implications of the multicenter randomized trials. *Circulation* 1985; **72**(6 Pt 2): V23-30.
2. Hannan EL, Zhong Y, Lahey SJ, et al. 30-day readmissions after coronary artery bypass graft surgery in New York State. *JACC Cardiovasc Interv* 2011; **4**(5): 569-76.
3. Hansen LS, Hjortdal VE, Andreassen JJ, Mortensen PE, Jakobsen CJ. 30-day mortality after coronary artery bypass grafting and valve surgery has greatly improved over the last decade, but the 1-year mortality remains constant. *Ann Card Anaesth* 2015; **18**(2): 138-42.
4. Veterans Administration Coronary Artery Bypass Surgery Cooperative Study G. Eleven-year survival in the Veterans Administration randomized trial of coronary bypass surgery for stable angina. *N Engl J Med* 1984; **311**(21): 1333-9.
5. Shekar PS. Cardiology patient page. On-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Circulation* 2006; **113**(4): e51-2.
6. Weisse AB. Cardiac surgery: a century of progress. *Tex Heart Inst J* 2011; **38**(5): 486-90.
7. Hobson CE, Yavas S, Segal MS, et al. Acute kidney injury is associated with increased long-term mortality after cardiothoracic surgery. *Circulation* 2009; **119**(18): 2444-53.
8. O'Neal JB, Shaw AD, Billings FTt. Acute kidney injury following cardiac surgery: current understanding and future directions. *Crit Care* 2016; **20**(1): 187.
9. Olivero JJ, Olivero JJ, Nguyen PT, Kagan A. Acute kidney injury after cardiovascular surgery: an overview. *Methodist DeBakey Cardiovasc J* 2012; **8**(3): 31-6.
10. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* 2012; **120**(4): c179-84.
11. Semler MW, Self WH, Wanderer JP, et al. Balanced Crystalloids versus Saline in Critically Ill Adults. *N Engl J Med* 2018; **378**(9): 829-39.
12. Bove T, Calabro MG, Landoni G, et al. The incidence and risk of acute renal failure after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; **18**(4): 442-5.
13. Roh GU, Lee JW, Nam SB, Lee J, Choi JR, Shim YH. Incidence and risk factors of acute kidney injury after thoracic aortic surgery for acute dissection. *Ann Thorac Surg* 2012; **94**(3): 766-71.
14. Kumar AB, Suneja M, Bayman EO, Weide GD, Tarasi M. Association between postoperative acute kidney injury and duration of cardiopulmonary bypass: a meta-analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; **26**(1): 64-9.
15. Arora P, Kolli H, Nainani N, Nader N, Lohr J. Preventable risk factors for acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; **26**(4): 687-97.
16. Lameire N, Biesen WV, Vanholder R. Acute kidney injury. *Lancet* 2008; **372**(9653): 1863-5.
17. Hudson C, Hudson J, Swaminathan M, Shaw A, Stafford-Smith M, Patel UD. Emerging concepts in acute kidney injury following cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2008; **12**(4): 320-30.
18. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2002; **62**(5): 1539-49.
19. Yang X, Zhu L, Pan H, Yang Y. Cardiopulmonary bypass associated acute kidney injury: better understanding and better prevention. *Ren Fail* 2024; **46**(1): 2331062.
20. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; **140**(6): 771-6.
21. Ratliff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky MS. Messengers without borders: mediators of systemic inflammatory response in AKI. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**(4): 529-36.
22. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(12): 826-37.
23. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**(10): 738-53.

24. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2008; **2**(3): 284-91.
25. Anders HJ. Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications. *Nat Rev Nephrol* 2014; **10**(6): 347-58.
26. Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2015; **30**(2): 199-209.
27. Montrieff T, Koyfman A, Long B. Coronary artery bypass graft surgery complications: A review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med* 2018; **36**(12): 2289-97.
28. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 2010; **16**(5): 535-43, 1p following 143.
29. Sato Y, Takahashi M, Yanagita M. Pathophysiology of AKI to CKD progression. *Semin Nephrol* 2020; **40**(2): 206-15.
30. Galvan DL, Green NH, Danesh FR. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; **92**(5): 1051-7.
31. Szeto HH, Liu S, Soong Y, et al. Mitochondria Protection after Acute Ischemia Prevents Prolonged Upregulation of IL-1beta and IL-18 and Arrests CKD. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**(5): 1437-49.
32. Celec P, Vlkova B, Laukova L, Babickova J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med* 2018; **20**: e1.
33. Zheng Y, Yi H, Zhan Z, et al. Reactive oxygen/nitrogen species scavenging and inflammatory regulation by renal-targeted bio-inspired rhodium nanozymes for acute kidney injury theranostics. *J Colloid Interface Sci* 2024; **662**: 413-25.
34. Lindau D, Mussard J, Wagner BJ, et al. Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. *Eur J Immunol* 2013; **43**(8): 2101-13.
35. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; **464**(7285): 104-7.
36. Jansen MP, Emal D, Teske GJ, Dessing MC, Florquin S, Roelofs JJ. Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps. *Kidney Int* 2017; **91**(2): 352-64.
37. Vives M, Hernandez A, Parramon F, et al. Acute kidney injury after cardiac surgery: prevalence, impact and management challenges. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2019; **12**: 153-66.
38. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**(8): 1375-88.
39. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm. *J Extra Corpor Technol* 2008; **40**(4): 257-67.
40. Palevsky PM. Endpoints for Clinical Trials of Acute Kidney Injury. *Nephron* 2018; **140**(2): 111-5.
41. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; **11**(2): R31.
42. Coleman MD, Shaefi S, Sladen RN. Preventing acute kidney injury after cardiac surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* 2011; **24**(1): 70-6.
43. Moresco RN, Bochi GV, Stein CS, De Carvalho JAM, Cembranel BM, Bollick YS. Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin Chim Acta* 2018; **487**: 15-21.
44. Crabbs TA. Acute Kidney Injury (AKI)-The Toxicologic Pathologist's Constant Companion. *Toxicol Pathol* 2018; **46**(8): 918-9.
45. Bove T, Monaco F, Covello RD, Zangrillo A. Acute renal failure and cardiac surgery. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth* 2009; **1**(3): 13-21.
46. Blantz RC. Pathophysiology of pre-renal azotemia. *Kidney Int* 1998; **53**(2): 512-23.
47. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012; **2**(2): 1303-53.
48. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; **334**(22): 1448-60.

49. Cicchillitti L, Corrado G, De Angeli M, et al. Circulating cell-free DNA content as blood based biomarker in endometrial cancer. *Oncotarget* 2017; **8**(70): 115230-43.
50. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1775**(1): 181-232.
51. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; **61**(4): 1659-65.
52. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; **313**(1-2): 139-42.
53. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **906**: 161-8.
54. Canzoniero JV, Park BH. Use of cell free DNA in breast oncology. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1865**(2): 266-74.
55. Stotzer OJ, Lehner J, Fersching-Gierlich D, Nagel D, Holdenrieder S. Diagnostic relevance of plasma DNA and DNA integrity for breast cancer. *Tumour Biol* 2014; **35**(2): 1183-91.
56. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016; **35**(3): 347-76.
57. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(6): 426-37.
58. Chan AK, Chiu RW, Lo YM, Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical B. Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2003; **40**(Pt 2): 122-30.
59. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther* 2016; **9**: 6549-59.
60. Lin SY, Linehan JA, Wilson TG, Hoon DSB. Emerging Utility of Urinary Cell-free Nucleic Acid Biomarkers for Prostate, Bladder, and Renal Cancers. *Eur Urol Focus* 2017; **3**(2-3): 265-72.
61. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; **13**(4): 463-9.
62. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; **584**(14): 3193-7.
63. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303**(5663): 1532-5.
64. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012; **7**(2): e32366.
65. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**(1): 147-51.
66. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009; **15**(6): 623-5.
67. Margraf S, Logters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 2008; **30**(4): 352-8.
68. Paunel-Gorgulu A, Wacker M, El Aita M, et al. cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 17421.
69. Likhvantsev VV, Landoni G, Grebenchikov OA, et al. Nuclear DNA as Predictor of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft: A Pilot Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017; **31**(6): 2080-5.
70. Scarscia G, Guida P, Rotunno C, de Luca Tupputi Schinosa L, Paparella D. Anti-inflammatory strategies to reduce acute kidney injury in cardiac surgery patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Artif Organs* 2014; **38**(2): 101-12.

71. Xu F, Tan X, Wang J, et al. Cell-free DNA predicts all-cause mortality of sepsis-induced acute kidney injury. *Ren Fail* 2024; **46**(1): 2273422.
72. Clementi A, Virzi GM, Brocca A, et al. The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif* 2016; **41**(1-3): 34-40.
73. Mandel P MP. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme; 1948.
74. Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* 1998; **351**(9112): 1329-30.
75. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2003; **327**(1-2): 95-101.
76. Rainer TH, Wong LK, Lam W, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; **49**(4): 562-9.
77. McCarthy CG, Wenceslau CF, Gouloupoulou S, et al. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2015; **107**(1): 119-30.
78. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**(21): 3902-8.
79. Shao X, He Y, Ji M, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncol Lett* 2015; **10**(6): 3478-82.
80. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; **37**(3): 646-50.
81. Zhu YJ, Zhang HB, Liu YH, et al. Quantitative cell-free circulating EGFR mutation concentration is correlated with tumor burden in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer* 2017; **109**: 124-7.
82. Sharon E, Shi H, Kharbanda S, et al. Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype. *PLoS Comput Biol* 2017; **13**(8): e1005629.
83. Burnham P, Khush K, De Vlaminck I. Myriad Applications of Circulating Cell-Free DNA in Precision Organ Transplant Monitoring. *Ann Am Thorac Soc* 2017; **14**(Supplement_3): S237-S41.
84. Tug S, Helmig S, Deichmann ER, et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev* 2015; **21**: 164-73.
85. Breitbach S, Tug S, Helmig S, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One* 2014; **9**(3): e87838.
86. O'Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, et al. Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj* 2017; **31**(10): 1369-75.
87. Wilson IJ, Burchell RK, Worth AJ, et al. Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *J Vet Intern Med* 2018; **32**(1): 157-64.
88. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* 2016; **14**(10): 898-908.
89. Brusca SB, Elinoff JM, Zou Y, et al. Plasma Cell-Free DNA Predicts Survival and Maps Specific Sources of Injury in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2022; **146**(14): 1033-45.
90. Perrotti A, Miltgen G, Chevet-Noel A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as early predictor of acute kidney injury after cardiac surgery in adults with chronic kidney failure. *Ann Thorac Surg* 2015; **99**(3): 864-9.
91. Perry TE, Muehlschlegel JD, Liu KY, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute postoperative kidney injury in adult cardiac surgical patients. *Anesth Analg* 2010; **110**(6): 1541-7.
92. Lin X, Yuan J, Zhao Y, Zha Y. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J Nephrol* 2015; **28**(1): 7-16.
93. Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res* 2014; **86**(3): 136-42.

94. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, et al. Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 306580.
95. Avriel A, Paryente Wiessman M, Almog Y, et al. Admission cell free DNA levels predict 28-day mortality in patients with severe sepsis in intensive care. *PLoS One* 2014; **9**(6): e100514.
96. Garnacho-Montero J, Huici-Moreno MJ, Gutierrez-Pizarra A, et al. Prognostic and diagnostic value of eosinopenia, C-reactive protein, procalcitonin, and circulating cell-free DNA in critically ill patients admitted with suspicion of sepsis. *Crit Care* 2014; **18**(3): R116.
97. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993; **268**(14): 10425-32.
98. Constantin JM, Futier E, Perbet S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *J Crit Care* 2010; **25**(1): 176 e1-6.
99. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* 2003; **171**(12): 6630-9.
100. Luchtefeld M, Preuss C, Ruhle F, et al. Gp130-dependent release of acute phase proteins is linked to the activation of innate immune signaling pathways. *PLoS One* 2011; **6**(5): e19427.
101. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 1994; **83**(3): 799-807.
102. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004; **432**(7019): 917-21.
103. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta* 2015; **438**: 350-7.
104. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; **365**(9466): 1231-8.
105. Antonucci E, Lippi G, Ticinesi A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a promising biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury (AKI). *Acta Biomed* 2014; **85**(3): 289-94.
106. Nadim MK, Forni LG, Bihorac A, et al. Cardiac and Vascular Surgery-Associated Acute Kidney Injury: The 20th International Consensus Conference of the ADQI (Acute Disease Quality Initiative) Group. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**(11).
107. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev* 2016; **37**(2): 85-98.
108. Cheruku SR, Raphael J, Neyra JA, Fox AA. Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery: Prediction, Prevention, and Management. *Anesthesiology* 2023; **139**(6): 880-98.
109. Jongman RM, Zijlstra JG, Kok WF, et al. Off-pump CABG surgery reduces systemic inflammation compared with on-pump surgery but does not change systemic endothelial responses: a prospective randomized study. *Shock* 2014; **42**(2): 121-8.
110. Conlon PJ, Stafford-Smith M, White WD, et al. Acute renal failure following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant* 1999; **14**(5): 1158-62.
111. Okusa MD. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* 2002; **90**(2): 133-8.
112. Zhang Y, Cai S, Xiong X, Zhou L, Shi J, Chen D. Intraoperative Glucose and Kidney Injury After On-Pump Cardiac Surgery: A Retrospective Cohort Study. *J Surg Res* 2024; **300**: 439-47.
113. Oprea AD, Del Rio JM, Cooter M, et al. Pre- and postoperative anemia, acute kidney injury, and mortality after coronary artery bypass grafting surgery: a retrospective observational study. *Can J Anaesth* 2018; **65**(1): 46-59.
114. Zhang M, Cai Y, Zhong X, et al. Effects of cell-free DNA on kidney disease and intervention strategies. *Front Pharmacol* 2024; **15**: 1377874.

115. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 5068.
116. Liu J, Dong Z. Neutrophil extracellular traps in ischemic AKI: new way to kill. *Kidney Int* 2018; **93**(2): 303-5.
117. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Rev Nephrol* 2016; **12**(7): 402-13.
118. Raup-Konsavage WM, Wang Y, Wang WW, Feliers D, Ruan H, Reeves WB. Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2018; **93**(2): 365-74.
119. Liang H, Peng B, Dong C, et al. Cationic nanoparticle as an inhibitor of cell-free DNA-induced inflammation. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 4291.
120. Dawulieti J, Sun M, Zhao Y, et al. Treatment of severe sepsis with nanoparticulate cell-free DNA scavengers. *Sci Adv* 2020; **6**(22): eaay7148.
121. Einbinder Y, Shnaider A, Ghanayem K, et al. Elevated Circulating Cell-Free DNA in Hemodialysis-Treated Patients Is Associated with Increased Mortality. *Am J Nephrol* 2020; **51**(11): 852-60.
122. Hoste EA, Blot SI, Lameire NH, Vanholder RC, De Bacquer D, Colardyn FA. Effect of nosocomial bloodstream infection on the outcome of critically ill patients with acute renal failure treated with renal replacement therapy. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**(2): 454-62.
123. Ho J, Reslerova M, Gali B, et al. Serum creatinine measurement immediately after cardiac surgery and prediction of acute kidney injury. *Am J Kidney Dis* 2012; **59**(2): 196-201.
124. De Loor J, Herck I, Francois K, et al. Diagnosis of cardiac surgery-associated acute kidney injury: differential roles of creatinine, chitinase 3-like protein 1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a prospective cohort study. *Ann Intensive Care* 2017; **7**(1): 24.
125. Zappitelli M, Bernier PL, Saczkowski RS, et al. A small post-operative rise in serum creatinine predicts acute kidney injury in children undergoing cardiac surgery. *Kidney Int* 2009; **76**(8): 885-92.
126. Soni SS, Cruz D, Bobek I, et al. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol* 2010; **42**(1): 141-50.
127. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; **318** (Pt 1)(Pt 1): 1-14.
128. Zappitelli M, Washburn KK, Arikian AA, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; **11**(4): R84.
129. Wagener G, Jan M, Kim M, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 2006; **105**(3): 485-91.
130. Henry BM, de Oliveira MHS, Cheruiyot I, et al. Cell-Free DNA, Neutrophil extracellular traps (NETs), and Endothelial Injury in Coronavirus Disease 2019- (COVID-19-) Associated Acute Kidney Injury. *Mediators Inflamm* 2022; **2022**: 9339411.
131. Dennhardt S, Ceanga IA, Baumbach P, Amiratashani M, Kroller S, Coldewey SM. Cell-free DNA in patients with sepsis: long term trajectory and association with 28-day mortality and sepsis-associated acute kidney injury. *Front Immunol* 2024; **15**: 1382003.
132. Martensson J, Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif* 2014; **37**(4): 304-10.
133. Andreev E, Koopman M, Arisz L. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: which drugs can be responsible? *J Intern Med* 1999; **246**(3): 247-52.
134. Goldstein SL. Urine Output Assessment in Acute Kidney Injury: The Cheapest and Most Impactful Biomarker. *Front Pediatr* 2019; **7**: 565.
135. Vanmassenhove J, Steen J, Vansteelandt S, et al. The importance of the urinary output criterion for the detection and prognostic meaning of AKI. *Sci Rep* 2021; **11**(1): 11089.
136. Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, et al. Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2006; **70**(1): 199-203.

137. Moriyama T, Hagihara S, Shiramomo T, Nagaoka M, Iwakawa S, Kanmura Y. Comparison of three early biomarkers for acute kidney injury after cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. *J Intensive Care* 2016; **4**: 41.
138. Yim J, Son NH, Kyong T, Park Y, Kim JH. Muscle mass has a greater impact on serum creatinine levels in older males than in females. *Heliyon* 2023; **9**(11): e21866.