

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg
Prof. Dr. med. Hans J. Schlitt
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*URINARY BIOMARKERS TIMP-2 AND IGFBP7 EARLY PREDICT ACUTE KIDNEY
INJURY AFTER MAJOR SURGERY*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ivan Göcze

2016

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg
Prof. Dr. med. Hans J. Schlitt

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*URINARY BIOMARKERS TIMP-2 AND IGFBP7 EARLY PREDICT ACUTE KIDNEY
INJURY AFTER MAJOR SURGERY*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ivan Göcze

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Thomas Bein*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. med. Carsten A. Böger*

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2016

Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery

Göcze I, Koch M, Renner P, Zeman F, Graf BM, Dahlke MH, Nerlich M, Schlitt HJ, Kellum JA, Bein T (2015) Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. PLoS One 10(3):e0120863

Titel der Studie

Die Urin-Biomarker TIMP-2 und IGFBP7 ermöglichen nach großen Operationen die frühzeitige Erkennung einer akuten Nierenschädigung

Ziel

Untersuchung der möglichen Früherkennung einer akuten Nierenschädigung (Acute Kidney Injury; AKI) mit den Urin-Biomarkern IGFBP7 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 7) und TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2) bei chirurgischen Hochrisikopatienten.

Einleitung

Eine postoperative AKI geht mit einem Anstieg der Kurz- und Langzeitmortalität einher. Die Verwendung von IGFBP7 und TIMP-2 zur Früherkennung von zellulären Nierenschädigungen und eine damit mögliche frühzeitige Einleitung der nierenprotektiven Therapiemaßnahmen könnte ein neues Konzept zur Evaluation der Nierenfunktion darstellen.

Methode

In dieser prospektiven Studie wurde bei chirurgischen Patienten mit einem hohen Risiko für AKI der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Wert im Urin gemessen. Ein vorgegebener Grenzwert von

(TIMP-2)*(IGFBP7) > 0,3 wurde zur Bewertung der diagnostischen Genauigkeit verwendet. Es wurden perioperative Charakteristiken untersucht, ROC-Analysen durchgeführt und logistische Regressionsmodelle zur Risikobewertung mit und ohne (TIMP-2)*(IGFBP7)-Test berechnet.

Ergebnisse

107 Patienten wurden in die Studie aufgenommen; 45 dieser Patienten (42 %) entwickelten eine AKI. Die höchsten Medianwerte der Biomarker wurden in septischen und transplantierten Patienten sowie nach Lebereingriffen festgestellt (1,24 vs. 0,45 vs. 0,47 ng/l²/1000). Die Fläche unter der Kurve (AUC) lag bei 0,85 für das Risiko einer AKI, bei 0,83 für die frühzeitige Durchführung einer Nierenersatztherapie (NET) und bei 0,77 für die 28-Tage-Mortalität. In einem multivariaten Modell mit bekannten perioperativen Risikofaktoren war der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Test der stärkste Prädiktor für eine AKI und verbesserte die Risikobewertung signifikant ($p < 0,001$).

Schlussfolgerung

Die Bestimmung der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Werte im Urin führte nach großen nicht-kardiochirurgischen Eingriffen zu einer Früherkennung von Patienten mit AKI-Risiko. Aufgrund der schnellen Reaktionszeit des Tests steht ein größeres Zeitfenster für Interventionen zur AKI-Prävention zur Verfügung.

SCHLÜSSELWÖRTER: akute Nierenschädigung; Risiko; Biomarker; große chirurgische Eingriffe; Mortalität

Die akute Nierenschädigung (acute kidney injury; AKI) ist ein klinisches Syndrom, charakterisiert durch eine abrupte – sich innerhalb von Stunden bis Tagen entwickelnde – Abnahme der Nierenfunktion [1]. Insbesondere bei Intensivpatienten ist die AKI-Inzidenz mit etwa 30% sehr hoch [2]. Bei chirurgischen Patienten ist AKI eine der häufigsten postoperativen Komplikationen und ist mit einem Anstieg der Mortalität im Krankenhaus und einem – über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren nach der Operation – verringerten Überleben verbunden [3-7]. Aktuelle Studien zeigen eine höhere Rate an Krankenhauskomplikationen bei Patienten mit akuter Nierenschädigung als für Patienten mit akutem Myokardinfarkt [8]. Aus ökonomischer Sicht ist die akute Nierenschädigung mit längerer Verweildauer im Krankenhaus, verlängerter intensivmedizinischer Betreuung und deutlich erhöhten Behandlungskosten verbunden [9].

Zahlreiche nicht-renale Faktoren, wie Muskelmasse, Volumenverschiebung und Hydrierung des Patienten, beeinflussen die Kreatinin-Konzentration – den Goldstandardmarker für AKI - und tragen zu einer erheblichen Verzögerung der Diagnosestellung bei. Somit werden die aktuellen Interventionen zur Prävention bzw. zur Therapie einer AKI derzeit erst in einer späten Phase der bereits etablierten Schädigung eingeleitet, so dass der Nutzen begrenzt bleibt [10]. Auch deswegen gibt es trotz zahlreichen Therapieansätzen aktuell keine direkte Therapie für die akute Nierenschädigung. Der größte Nachteil des Kreatinins besteht aber darin, dass der Wert erst bei einem Abfall der Nierenfunktion um >50% ansteigt und somit weniger ausgeprägte Nierenschädigungen nicht anzeigt (s.g. Kreatinin-blinder Bereich) [11].

Die Verwendung von strukturellen Biomarkern zur Früherkennung von zellulären Nierenschädigungen könnte ein neues Konzept zur Beurteilung der Nierenfunktion darstellen. Das von der ADQI-Gruppe entworfene Modell beschreibt die AKI als Kontinuum, basierend auf klassischen Funktionsmarkern (Kreatinin) und zusätzlichen Biomarkern für die

strukturelle Schädigung. Die zellulären Biomarkern weisen auf direkte Schädigung der tubulären Zellen hin und liefern somit eine komplementäre Information zu den bisher eingesetzten funktionellen Markern wie Kreatinin, was eine frühere Diagnose der akuten Nierenschädigung zusammen mit frühzeitiger Initiierung der nierenprotektiven Maßnahmen und zukünftigen therapeutischen Interventionen ermöglichen könnte [12]. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass ein akuter Tubuluszellstress oder Schaden oftmals das Primärereignis für eine sich entwickelnde akute renale Dysfunktion darstellt. Histologische Befunde verstorbener septischer Patienten zeigen die Assoziation zwischen dem Ausmaß und Schweregrad der akuten tubulären Zellschädigung und einem höheren Risiko für die Einleitung einer Nierenersatztherapie [13].

Die Kombination von zwei neuartigen Zellzyklusarrest-Urin-Biomarkern – des Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 und des Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 7 [(TIMP-2)*(IGFBP7)] – war in zwei multizentrischen Studien zur Erkennung des Risikos für mäßige und schwere AKI bei kritisch kranken Patienten beschrieben und validiert worden. Die Biomarker wurden in den ersten 18 Stunden nach der Aufnahme auf die Intensivstation untersucht. Ein erhöhter [(TIMP-2)*(IGFBP7)] Wert war mit einem bis zu 7-fach höherem Risiko für eine mäßige und schwere AKI verbunden [14,15]. Sowohl TIMP2 als auch IGFBP7 sind Marker für zellulären Stress in der Frühphase tubulärer Zellschädigungen, die unterschiedlichste Auslöser haben können (Entzündungen, Ischämie, oxidativer Stress, Medikamente und Toxine) [16-18]. Dementsprechend sind beide Marker am Prozess des G1-Zellzyklusarrest beteiligt, in dem die Zellen im Fall von drohendem DNA-Schäden an der Teilung gehindert werden, solange das Risiko/Schäden nicht behoben wurden [19]. Dabei ist wichtig, dass beide Biomarker auch „Alarmproteine“ (parakrin) für andere Zellen in der näheren Umgebung sind [20,21]. Mit diesen beiden Biomarkern wurde im Hinblick auf die AKI-Früherkennung eine bessere Prädiktion erzielt als mit anderen Biomarkern wie NGAL

(AUC 0,64), KIM-1 (AUC 0,69), IL-18 (AUC 0,76), L-FABP (AUC 0,66) oder Cystatin C (AUC 0,63) [14]. Bei kardiochirurgischen Patienten dient der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Wert als empfindlicher Prädiktor für eine AKI und könnte unter Verwendung eines Grenzwerts von 0,5 dazu beitragen, eine renale Erholung nach AKI vorherzusagen [22].

Das Ziel unserer Studie war es, die Vorhersagekraft dieser Biomarker bei nicht-kardiochirurgischen AKI-Risiko Patienten zu prüfen. Im Vergleich zu der Validierungsstudie wurden hier die Biomarker in einer sehr frühen postoperativen Phase gemessen. Darüber hinaus untersuchten wir das erste Mal die Funktion des (TIMP-2)*(IGFBP7)-Tests bei unterschiedlichen AKI-Schweregraden (mit oder ohne Stadium 1). Zur Risikostratifizierung erfassten wir neben den perioperativen renalen Risikofaktoren auch die bettseitigen klinischen Stressoren mit dem Ziel, die Risiko-Früherkennung durch diese Faktoren mit der Vorhersagekraft der Biomarker zu vergleichen. Schließlich untersuchten wir den Zusammenhang zwischen einem postoperativen Zellzyklusarrest in den Tubuluszellen und der 28-Tages-Mortalität.

Für die Studie wurden 107 Patienten der interdisziplinären operativen Intensivstation (ITS) untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (13-101-0191). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten oder von den nächsten Verwandten eingeholt. Eingeschlossen wurden alle Patienten ab 18 Jahren nach einem, großen nicht-kardiochirurgischen operativen Eingriff mit mindestens einem weiteren Risikofaktor für AKI – wie Trauma, Sepsis, kritischer Zustand, chronische Nierenerkrankung oder intraoperative intravenöse Gabe des Röntgenkontrastmittels. Kritischer Zustand war definiert als die Notwendigkeit einer medikamentösen Kreislaufunterstützung oder künstlichen Beatmung, zum Zeitpunkt der Aufnahme auf die Intensivstation. Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz oder

einer bereits während der Zeit vor der Biomarkeruntersuchung entwickelten AKI waren ausgeschlossen.

Nach der Aufnahme auf die Intensivstation wurden über den Blasenkatheter Urinproben zur Biomarkeruntersuchung entnommen. Der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Wert wurde mit Hilfe eines Immunoassay-Verfahrens ermittelt, das im Astute 140 Meter Kit (Astute Medical Inc., San Diego, CA, USA) enthalten ist. Alle (TIMP-2)*(IGFBP7)-Werte werden in der Einheit $(\text{ng/ml})^2 / 1000$ angegeben. In Übereinstimmung mit der Validierungsstudie wurde für die Früherkennung einer AKI ein (TIMP-2)*(IGFBP7)-Grenzwert von $> 0,3$ verwendet [14]. Inzidenz und Schweregrad einer AKI wurden während der ersten 48 h nach der Aufnahme auf die Station erfasst [23]. Darüber hinaus wurden etablierte perioperative Risikofaktoren und Stressoren wie der Simplified Acute Physiology Score II (SAPS-II) bei Aufnahme, Alter, Geschlecht, Gewicht (kg), Körpergröße (m), Kreatininwert und Noradrenalin-Dosis ($\mu\text{g/kg/min}$) bei Aufnahme auf die Intensivstation, der mittlere arterielle Druck (MAP), Hämoglobinwert (g/dl), kumulative Flüssigkeitsbilanz (ml/24 h) und die Diurese (ml/kg/h) zum Zeitpunkt der Biomarkeruntersuchung evaluiert.

Der mittlere Zeitraum zwischen der Aufnahme auf der Intensivstation und der Biomarkeruntersuchung betrug 245 Minuten (SD 152). 45 Patienten (42%) entwickelten während der ersten 48 h ihres Aufenthalts auf der Intensivstation eine AKI, 24 Patienten (22%) hatten eine mäßige oder schwere AKI (Stadium 2 und 3), und 10 Patienten (9%) benötigten innerhalb der ersten 48 h nach Zuerlegung eine Nierenersatztherapie (NET). 8 Patienten (8%) verstarben auf der Intensivstation, und 10 Patienten (9,3%) innerhalb der ersten 28 Tage nach der Operation. Nach Subgruppen unterteilt wurden folgende Ergebnisse ermittelt: 1 der 12 Patienten nach hepatobiliären Eingriffen entwickelte eine AKI, 6 der 14 Transplantationspatienten, 4 der 13 onkochirurgischen Patienten, 16 der 33 Patienten mit

Gefäßeingriffen, 9 der 21 Patienten mit Polytrauma und 8 der 10 septischen Patienten. Der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Medianwert bei Patienten ohne AKI lag bei 0,19 (IQR 0,1; 0,34); bei Patienten mit AKI im Stadium 1 bei 0,51 (IQR 0,38; 2,66); bei Patienten mit Stadium 2 und 3 bei 1,24 (IQR 0,56; 3,00); und bei Patienten, die anschließend eine NET erhielten, bei 1,35 (IQR 0,76; 3,39). Die NET wurde nach einem mittleren Zeitraum von 22,06 Stunden (SD 14,8) nach der Biomarkeruntersuchung bzw. < 48 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation begonnen (bei 5 Patienten aufgrund einer refraktären Hyperkaliämie, bei 1 Patienten aufgrund einer schweren Azidose und bei 4 Patienten aufgrund einer Oligurie < 0,3 ml/kg/h für > 24 Stunden). Die AUC für die Vorhersage einer AKI (alle Stadien) lag bei 0,85 (95%-KI: 0,78; 0,93) bzw. für die Vorhersage einer AKI der Stadien 2 und 3 bei 0,85 (95%-KI: 0,78; 0,92), für die frühzeitige Anwendung einer NET bei 0,83 und für die 28-Tage-Mortalität bei 0,77 (95%-KI: 0,67; 0,80).

Durch die Hinzunahme der Biomarker zur etablierten perioperativen Risikofaktoren verbesserte sich die AKI-Prädiktion signifikant: die AUC vergrößerte sich von 0,72 (95%-KI: 0,62; 0,81) auf 0,88 (0,82; 0,94), $p < 0,001$, und die AUC für eine AKI der Stadien 2 und 3 von 0,81 (0,70; 0,90) auf 0,87 (0,79; 0,95), $p < 0,001$.

Durch die Kombination des (TIMP-2)*(IGFBP7)-Tests mit den postoperativen klinischen Nierenstressoren wurde die prädiktive Aussagekraft im Hinblick auf eine AKI signifikant verbessert ($p < 0,001$); die AUC vergrößerte sich von 0,81 (95%-KI: 0,73; 0,90) auf 0,89 (95%-KI: 0,83; 0,96). Die AUC für eine AKI der Stadien 2 und 3 betrug 0,87 (95%-KI: 0,78; 0,96) und vergrößerte sich auf 0,89 (95%-KI: 0,81; 0,97), $p = 0,002$. Der gleiche Effekt wurde für die NET-Anwendung beobachtet, wobei sich die AUC von 0,85 (0,69; 1,00) auf 0,86 (0,73; 0,99) vergrößerte ($p = 0,035$).

In unserer Studie wurde die prognostische Aussagekraft der tubulären Zellzyklusarrest-Urin-Biomarker (TIMP-2)*(IGFBP7) bei Patienten mit einem hohen AKI-Risiko (mit mindestens

einem zusätzlichen Risikofaktor gemäß KDIGO-Empfehlungen [23]) nach großen operativen Eingriffen evaluiert. Es ist die erste Studie, die eine sehr frühe Anwendung dieser neuartigen Biomarker in der Kohorte von nicht-kardiochirurgischen Patienten untersucht.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass:

1.) Neben einer guten Vorhersehbarkeit von mäßigen und schweren AKI – wie sie in der Validierungsstudie gezeigt wurde – können alle AKI-Stadien (mit und ohne Stadium 1) unter Verwendung eines vorgegebenen Grenzwerts von 0,3 vorhergesagt werden. Erwartungsgemäß waren die höhere (TIMP-2)*(IGFBP7)-Werte mit einem erhöhten Grad der akuten Nierenschädigung verbunden, mit höchsten Werten für Patienten, die eine NET benötigten. Dieser Zusammenhang ist von zentraler Bedeutung und zeigt, dass der Schweregrad der funktionellen Beeinträchtigung in weiterem Verlauf mit dem Ausmaß der frühen zellulären Schädigung assoziiert ist.

2.) Im Vergleich zur Validierungs-Studie, bei der Biomarkermessungen in den ersten 18 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation durchgeführt wurden, erfolgte die Risikostratifizierung in unserer Studie zu einem sehr frühen postoperativen Zeitpunkt (durchschnittlich nach 4 Stunden). Diese Ergebnisse zeigen die schnelle Reaktionszeit des Tests, die frühzeitige Risikostratifizierung in der Zukunft ermöglichen kann.

3.) Im multivariaten Modell mit perioperativen Risikofaktoren und bettseitigen klinischen Parametern war der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Test stärkster Prädiktor und verbesserte signifikant die Früherkennung von postoperativen Risiko-Patienten.. Etablierte perioperative Risikofaktoren wie Alter, Kreatininwert bei der Aufnahme und der Krankheitsschweregrad wurden zusammen mit klinischen Stressoren (Diurese, Hämoglobinwert, mittlerer arterieller Druck, Flüssigkeitshaushalt und Bedarf von Vasopressoren) evaluiert. Alle diese Parameter sind mit erhöhtem Risiko einer AKI assoziiert [24-28]. Addierung des (TIMP-2)*(IGFBP7)-Tests in die beide Modelle verbesserte die AKI-Früherkennung signifikant. Darüber hinaus war in beiden klinischen Modellen die AUC der zellulären Biomarker allein größer als für die

etablierte Risikofaktoren (0,85 für Biomarker allein vs. 0,72 für perioperative und 0,81 für bettseitige klinische Parametern).

4.) Ein anhaltender Zellzyklusarrest früh postoperativ könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit mit schlechterem Outcome verbunden sein. Die Hinzunahme des (TIMP-2)*(IGFBP7)-Tests zur Beurteilung des Risikos der 28-Tage-Mortalität zeigte den Trend zur verbesserten Vorhersagekraft in beiden Modellen (AUC-Verbesserung von 0,76 auf 0,81 bzw. von 0,80 auf 0,83). Allerdings war dieser Zusammenhang statistisch nicht signifikant. Der Medianwert des (TIMP-2)*(IGFBP7)-Tests war bei Patienten, die innerhalb von 28 Tagen nach der Operation verstarben, niedriger als der Medianwert von Patienten, die eine AKI der Stadien 2-3 entwickelten oder eine NET erhielten. Diese Daten unterstreichen die Tatsache, dass der (TIMP-2)*(IGFBP7)-Test primär der Bewertung des AKI-Risikos dient. Allerdings unterstützen diese Ergebnisse aktuelle Daten, die nahelegen, dass ein asymptomatischer Stress oder Schädigung auf zellulärer Ebene, das Risiko für postoperative Frühmortalität erhöhen könnte. [29].

Zum Schluss, interessanterweise standen in der Subgruppe der Patienten mit großen Leberoperationen relativ hohe Medianwerte der Biomarker für eine zelluläre Schädigung nur einem einzigen nachfolgenden Fall einer AKI innerhalb von 48 Stunden nach der Operation gegenüber. Die Einhaltung eines niedrigen zentral venösen Druckes (ZVD) durch restriktiven Volumenersatz ist eine wirksame und standardisierte Methode zur Verringerung der intraoperativen Blutung in der Leberchirurgie [30]. Allerdings führt dieses Verfahren zur perioperativen Hypovolämie, die mit einem erhöhten Risiko einer postoperativen AKI verbunden sein kann [31]. Daher erhalten Patienten nach einer Leberresektion während der frühen postoperativen Phase eine höhere Flüssigkeitszufuhr, um den Flüssigkeitsstatus zu normalisieren und eine protrahierte perioperative Hypoperfusion der Organe zu verhindern. In unserer Studie wurde in der Subgruppe der Patienten nach Lebereingriffen (im Vergleich zu Patienten nach Tumoroperationen mit sehr ähnlichen Patientencharakteristiken) während der

ersten 24 postoperativen Stunden erwartungsgemäß eine unverhältnismäßig hohe positive Flüssigkeitsbilanz beobachtet (1419 vs. 939 ml/24 h). Dieser Aspekt könnte indirekt darauf hinweisen, dass die frühzeitige Korrektur einer Hypovolämie den frühen Zellzyklusarrest umkehren und die Entwicklung einer AKI verhindern kann.

Unsere Studie weist mehrere Einschränkungen auf. Es handelt sich um eine monozentrische Studie, auch wenn wir unserer Meinung nach eine repräsentative Kohorte nicht-kardiochirurgischer postoperativer Intensivpatienten untersucht haben. Unsere Ergebnisse beinhalten hohe Raten einer AKI (> 42 %) bzw. einer NET-Anwendung (> 10%). Die hohe AKI-Inzidenz – welche die prädiktive Leistung von Biomarkern beeinflussen kann – ist auf das Studiendesign zurückzuführen, nachdem nur Patienten mit einem hohen Risiko für AKI eingeschlossen wurden. Die (TIMP-2)*(IGFBP7)-Biomarker, ähnlich zu anderen zellulären Marker mit höher Sensitivität und niedriger Spezifität, wie z.B. Troponin, zeigen bessere prädiktive Werte für Patienten mit entsprechenden klinischen Symptomen und Risikofaktoren, hingegen haben positive Testergebnisse wenig Aussagekraft bei Patienten, die asymptomatisch und ohne Risiko sind [32]. Zudem wurde in einer weiteren aktuellen Studie eine sehr ähnliche Inzidenz der postoperativen AKI von 39% in einer Kohorte von 50.314 Patienten nach großen operativen Eingriffen festgestellt [33]. Schließlich haben wir bei den Patienten mit mittels (TIMP-2)*(IGFBP7)-Test nachgewiesenen zellulären Schädigungen die langfristigen Behandlungsergebnisse (> 28 Tage) nicht untersucht. Diese Aspekte müssen in zukünftigen Studien erforscht werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die tubuläre Stressmarker (TIMP-2)*(IGFBP7) die Früherkennung von jedweder AKI bei chirurgischen Hochrisikopatienten signifikant verbessert. Zusammen mit den bekannten Risikofaktoren und bettseitigen klinischen Stressoren unterstützt dieser Test die Kliniker bei einer präziseren Früherkennung von

Patienten, bei denen nierenprotektive Maßnahmen und ggf. eine Therapieerweiterung konsequent erfolgen sollten. Dieser Prozess könnte sehr früh nach der Operation eingeleitet werden, da die Biomarker sehr früh ansteigen, bevor die Schädigung stattfindet. Insbesondere eine frühzeitige hämodynamische Optimierung, mit Korrektur der Hypovolämie und Vermeidung der Hypotonie, scheint bei chirurgischen Patienten das Risiko von Nierenfunktionsstörungen zu verringern [34]. Gleichzeitig könnten vermeidbare Auslöser der AKI, wie nephrotoxische Substanzen, frühzeitig dosisadaptiert oder vermieden werden. Aktuelle Daten zeigen, dass eine frühe nephrologische Konsultation zur Verbesserung der Prognose von AKI-Patienten führen kann [35,36]. So könnten in der Zukunft die Marker der tubulären Schädigung als frühzeitiger laborwert-basierter AKI-Alarm- bzw. Warnsystem fungieren. Ob eine frühzeitige und genauere Risikostratifizierung durch tubuläre Biomarker bessere Behandlungsergebnisse für AKI Patienten erbringen kann, muss in den zukünftigen Studien untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-66.
2. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R et al (2005) Acute renal failure in critically ill patients: a multinational multicenter study. *JAMA*. 2005;294:813-818
3. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med*. 2008;36:S146-51
4. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, et al. (2013) Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-932.
5. Bihorac A, Yavas S, Subbiah S, Hobson CE, Schold JD, Gabrielli A, et al. Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg*. 2009; 249(5):851-8
6. White LE, Hassoun HT, Bihorac A, Moore LJ, Sailors RM, McKinley BA, et al. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;75(3):432-8
7. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;(Epub ahead of print)
8. Chawla LS, Amdur RL, Shaw AD, Faselis C, Palant CE, Kimmel PL. Association between AKI and long-term renal and cardiovascular outcomes in United States veterans. *J Am Soc Nephrol*. 2014;9:448-56
9. Göcze I, Bergler T, Bossauer E, Zeman F, Thelen K, Graf BM, et al. The challenge of acute kidney injury : Cross-sectional study on prevalence and costs in a university intensive care unit. *Med Klin Intensivmed Notfallmed*. 2015;Oct 12. [Epub ahead of print]
10. Kim CS, Oak CY, Kim HY, Kang YU, Choi JS, Bae EH, et al. Incidence, predictive factors, and clinical outcomes of acute kidney injury after gastric surgery for gastric cancer. *PLoS One* 2013; 9:8(12)
11. Haase M, Kellum JA, Ronco. Subclinical AKI--an emerging syndrome with important consequences. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(12):735-9.
12. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*. 2015;85(3):513-21.
13. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, et al. Mechanism of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:509-517

14. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care*. 2013;6:17(1)
15. Bihorac A, Chawla LS, Shaw AD, Al-Khafaji A, Davison DL, Demuth GE et al. Validation of Cell-Cycle Arrest Biomarkers for Acute Kidney Injury Using Clinical Adjudication. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:932-939
16. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2009; 76(6):604-13
17. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2014;337:1-13
18. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:7475-7484
19. Yang QH, Liu DW, Long Y, Liu HZ, Chai WZ, Wang XT. Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation. *J Infect*. 2009;58:459-464
20. Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP- independent mechanism. *Cell*. 2003;114:171-180
21. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008;132:363-374
22. Meersch M, Schmidt C, Van Aken H, Martens S, Rossaint J, Singbartl K, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PloS One*. 2014; 9(3).
23. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann EA, Goldstein SL, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury 2012. *Kidney Int*. 2012; suppl 2(1):1-138.
24. Macedo E, Malhotra R, Bouchard J, Wynn SK, Mehta RL. Oliguria is an early predictor of higher mortality in critically ill patients. *Kidney Int*. 2011;80(7):760-7
25. RENAL Replacement Therapy Study Investigators, Bellomo R, Cass A, Cole L, Finfer S, Gallagher M, et al. An observational study fluid balance and patient outcomes in the Randomized Evaluation of Normal vs. Augmented Level of Replacement Therapy trial. *Crit Care Med*. 2012;40(6):1753-60
26. Bartels K, Karhausen J, Clambey ET, Grenz A, Eltzschig HK. Perioperative organ injury. *Anesthesiology*. 2013;119(6):1474-89.
27. Walsh M, Garg AX, Devereaux PJ, Argalious M, Honar H, Sessler DI. The association between perioperative hemoglobin and acute kidney injury in patients having noncardiac surgery. *Anesth Analg*. 2013;117(4):924-31.

28. Asfar P, Meziani F, Hamel JF, Grelon F, Megarbane B, Anguel N, et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2014;24;370(17)
29. Murugan R., Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4), 209–217
30. Jones RM, Moulton CE, Hardy KJ. Central venous pressure and its effect on blood loss during liver resection. *Br J Surg*. 1998;85(8):1058-60.
31. Spolverato G, Ejaz A, Hyder O, Kim Y, Pawlik TM. Failure to rescue as a source of variation in hospital mortality after hepatic surgery. *Br J Surg*. 2014;101(7):836-46.
32. Vijayan A, Faubel S, Askenazi DJ, Cerda J, Fissel WH, Heung M, et al. American Society of Nephrology Acute Kidney Injury Advisory Group. Clinical use of the urine biomarker [TIMP-2]x[IGFBP7] for acute kidney injury risk assessment. *Am J Kidney Dis*. 2016 Mar 4. [Epub ahead of print]
33. Hobson C, Ozrazgat-Baslanti T, Kuxhausen A, Thottakkara P, Efron PA, Moore FA et al. Cost and Mortality Associated With Postoperative Acute Kidney Injury. *Ann Surg*. 2014; [Epub ahead of print]
34. Brienza N, Giglio MT, Marucci M, Fiore T. Does perioperative hemodynamic optimization protect renal function in surgical patients? A meta-analytic study. *Crit Care Med*. 2009;37(6):2079-90
35. Ponce D, Zorzenon Cde P, dos Santos NY, Balbi AL. Early nephrology consultation can have an impact on outcome of acute kidney injury patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:3202-3206
36. Balasubramanian G, Al-Aly Z, Moiz A, Rauchman M, Zhang Z, Gopalakrishnan R, et al. Early nephrologist involvement in hospital-acquired acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:2215-2225

Danksagung

Lieber Thomas,

ich danke Dir sehr für die Freiräume und Unterstützung, die ich von Dir bekommen habe. Ich danke Dir für deinen fachlichen Rat und für unsere Gespräche, die mir geholfen haben, nicht nur diese Arbeit durchzuführen, sondern mir die Freude und den notwendigen „Biss“ für die tägliche klinische Wissenschaft vermittelt haben.

Ich danke auch Herrn Professor Schlitt und Herrn Professor Kellum dafür, dass Sie stets Ansprechpartner waren und diese Arbeit durch Ihre Ideen und Anregungen bereicherten.

RESEARCH ARTICLE

Urinary Biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 Early Predict Acute Kidney Injury after Major Surgery

Ivan Gocze^{1*}, Matthias Koch², Philipp Renner¹, Florian Zeman³, Bernhard M. Graf⁴, Marc H. Dahlke¹, Michael Nerlich², Hans J. Schlitt¹, John A. Kellum⁵, Thomas Bein^{1,3}

1 Department of Surgery, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany, **2** Department of Trauma Surgery, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany, **3** Center for Clinical Studies, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany, **4** Department of Anesthesiology, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany, **5** Center for Critical Care Nephrology and CRISMA (Clinical Research, Investigation, and Systems Modeling of Acute Illness) Center, Department of Critical Care Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15621, United States of America

* ivan.gocze@ukr.de



OPEN ACCESS

Citation: Gocze I, Koch M, Renner P, Zeman F, Graf BM, Dahlke MH, et al. (2015) Urinary Biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 Early Predict Acute Kidney Injury after Major Surgery. PLoS ONE 10(3): e0120863. doi:10.1371/journal.pone.0120863

Academic Editor: Alexander Zarbock, University Hospital Münster, GERMANY

Received: November 18, 2014

Accepted: January 27, 2015

Published: March 23, 2015

Copyright: © 2015 Gocze 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 paper.

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

Competing Interests: JAK has received grant support and consulting fees from Astute Medical. IG received honoraria for lectures from Astute Medical. There was no commercial sponsorship or any financial support related to this study. All other authors declare that they have no competing interests. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Abstract

Objective

To assess the ability of the urinary biomarkers IGFBP7 (insulin-like growth factor-binding protein 7) and TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) to early predict acute kidney injury (AKI) in high-risk surgical patients.

Introduction

Postoperative AKI is associated with an increase in short and long-term mortality. Using IGFBP7 and TIMP-2 for early detection of cellular kidney injury, thus allowing the early initiation of renal protection measures, may represent a new concept of evaluating renal function.

Methods

In this prospective study, urinary [TIMP-2]×[IGFBP7] was measured in surgical patients at high risk for AKI. A predefined cut-off value of [TIMP-2]×[IGFBP7] >0.3 was used for assessing diagnostic accuracy. Perioperative characteristics were evaluated, and ROC analyses as well as logistic regression models of risk assessment were calculated with and without a [TIMP-2]×[IGFBP7] test.

Results

107 patients were included in the study, of whom 45 (42%) developed AKI. The highest median values of biomarker were detected in septic, transplant and patients after hepatic surgery (1.24 vs 0.45 vs 0.47 ng/l²/1000). The area under receiving operating characteristic

curve (AUC) for the risk of any AKI was 0.85, for early use of RRT 0.83 and for 28-day mortality 0.77. In a multivariable model with established perioperative risk factors, the [TIMP-2]×[IGFBP7] test was the strongest predictor of AKI and significantly improved the risk assessment ($p < 0.001$).

Conclusions

Urinary [TIMP-2]×[IGFBP7] test sufficiently detect patients with risk of AKI after major non-cardiac surgery. Due to its rapid responsiveness it extends the time frame for intervention to prevent development of AKI.

Introduction

Postoperative acute kidney injury (AKI) is one of the most common postoperative complications and is associated with an increase in hospital mortality and decreased survival for up to 15 years after surgery [1–5]. The prognosis of patients with AKI is still poor, intervention for prevention and therapy of AKI are currently only initiated in the late phase of already established injury; therefore, benefits remain limited [6].

Using biomarkers for the early detection of cellular injury, thus allowing the early initiation of renal protection measures, may represent a new concept of evaluating renal function in critically ill patients [7,8]. Combination of two novel urinary cell-cycle arrest biomarkers, i.e. the insulin-like growth factor-binding protein 7 and the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 ([TIMP-2]×[IGFBP7] panel) was described and validated in two multicenter studies for prediction of risk of moderate and severe AKI (AKI stage 2 and 3 according to KDIGO 2012 classification) in critically ill patients. Both TIMP2 and IGFBP7 are markers of cellular stress in the early phase of tubular cell injury caused by a wide variety of insults (inflammation, ischemia, oxidative stress, drugs, and toxins) [9–12]. Therefore, both markers are involved in the process of G1 cell-cycle arrest that prevents cells from dividing in the case of damage to the DNA until such damage can be repaired [13]. Importantly, both biomarkers appear as “alarm” proteins for other nearby cells in a paracrine fashion [14,15]. These two biomarkers performed better in prediction of AKI than NGAL (AUC 0.64), KIM-1 (AUC 0.69), IL-18 (AUC 0.76), L-FABP (AUC 0.66), or Cystatin C (AUC 0.63) [16,17]. In cardiac surgery patients act [TIMP-2]×[IGFBP7] as a sensitive predictor of AKI and may help to predict renal recovery after AKI using cutoff of 0.5 [18].

The aim of the current study was to evaluate, how the biomarker would perform in non-cardiac surgical patients, if assessed in very early phase after surgery by using a validated cutoff of > 0.3 . Moreover, we investigated the performance of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test across different severities of AKI (including or excluding stage 1). In addition to perioperative risk factors, we assessed the risk stratification in conjunction with bedside clinical parameters at the time of biomarker assessment. Finally we tested the relation between early cell cycle arrest in the kidney and outcome in surgical patients.

Methods

Patients

120 patients were evaluated between May 2013 and November 2013 in the multidisciplinary surgical ICU of a tertiary care university hospital; 13 patients were excluded because they had

already developed AKI before biomarker assessment (based on an increase in SCr >0.3 after surgery) (Fig. 1). The study was approved by the local Institutional Review Board (Ethics Committee, University of Regensburg, no. 13-101-0191). Written consent was obtained from all patients or from their next of kin. All patients over the age of 18 years, who had received major non-cardiac surgery, were transported to the ICU immediately after the completion of surgery. Additionally, the patients had at least one risk factor for AKI, such as trauma, sepsis, critical

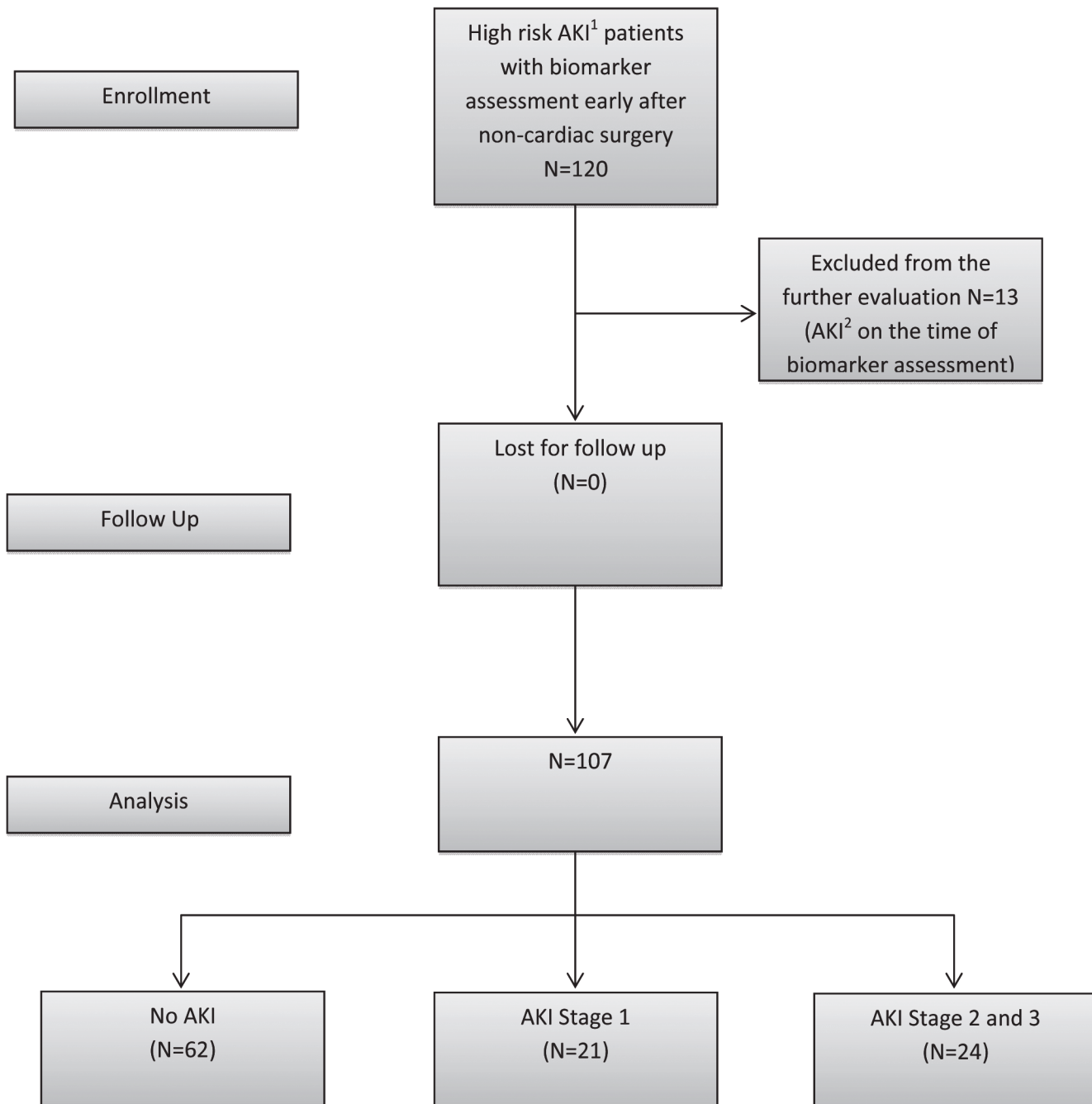


Fig 1. Study design and flow diagram. ¹ High Risk for AKI—major surgery and one additional risk factor—critical illness, sepsis, major trauma, chronic renal disease or use of radiocontrast agent. ² AKI was defined according to KDIGO 2012 criteria by creatinine increase of > 0.3 after surgery.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.g001

illness, chronic renal disease, and use of an intravenous radiocontrast agent and were thus eligible for inclusion into the study. Critical illness was defined as requirement of inotropic support or mechanical ventilation at the time of admission to the ICU. Patients were excluded if they had end-stage renal disease or developed AKI during the period of time until biomarker assessment.

Measurements

Urine samples for biomarker assessment were taken from the urinary catheter of eligible patients soon after the transfer from the operating theatre to the ICU. The level of [TIMP-2]×[IGFBP7] was measured by means of the immunoassay method integrated in the Astute 140 Meter Kit (Astute Medical Inc., San Diego, CA, USA). All values for [TIMP-2]×[IGFBP7] are reported in units of $(\text{ng/mL})^2 / 1000$. In accordance with the validation study, the cut-off of [TIMP-2]×[IGFBP7] >0.3 was used for predicting AKI [16]. The incidence and severity of AKI based on SCr, UO, and provision of RRT were assessed over the first 48 h after admission. SCr was measured before surgery, at admission to the ICU, and then daily during the ICU stay. UO was assessed hourly during the first 48 h. In addition, we recorded different variables, such as type of surgery or diagnosis at admission, the Simplified Acute Physiology Score II (SAPS-II) at admission, age, sex, weight (kg), height (m), creatinine level and norepinephrine dosage ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) at ICU admission, mean arterial pressure (MAP), hemoglobin level (g/dL), cumulative fluid balance (mL/24 h), and urine production (mL/kg/h) at the time of biomarker assessment.

Statistical methods

Continuous variables are presented as a mean (standard deviation [SD]), and categorical data as frequency counts (percentages). [TIMP-2]×[IGFBP7] values are presented as median values (interquartile ranges [IQR]) and as range because of the skewed distribution of the data. Continuous variables were compared by the Student's *t* test or the Mann-Whitney *U* test, depending on the distribution of the observed data. Receiver-operating characteristic (ROC) analyses were conducted to differentiate between patient groups ((all stages of AKI [yes/no], moderate or severe AKI [yes/no], RRT [yes/no], and ICU mortality [yes/no]), and the optimal cutoff was estimated according to the Youden Index. Estimates for the area under the curve (AUC) with the corresponding 95% confidence interval (CI) were reported as well as sensitivity and specificity. Multivariable logistic regression models were calculated by means of odds ratios (OR's) and corresponding 95% CI's to assess the predictive ability of [TIMP-2]×[IGFBP7] for AKI development, for use of RRT and for 28-day mortality. To compare the fit of two nested models, we calculated AUCs of the predicted probabilities and conducted a likelihood-ratio test. A value of $P \leq 0.05$ was considered to indicate statistical significance. All analyses were done with IBM SPSS Statistics 21.0.0.1 and R (version 3.0.2).

Results

Baseline and clinical characteristics; ROC analysis

The baseline characteristics of the patients are shown in [Table 1](#). The mean time between admission to the ICU and biomarker assessment was 245 minutes (SD 152). 45 (42%) patients developed AKI in the first 48 h of their ICU stay, 24 (22%) patients had moderate and severe AKI (stage 2 and 3), and 10 (9%) patients required RRT within the first 48 h after admission. 8 (8%) patients died in the ICU and 10 (9.3%) patients within the first 28 days after surgery. In the hepatobiliary subgroups of patients 1 of 12 developed AKI, 6 of 14 transplant patients, 4 of 13 cancer patients, 16 of 33 after vascular surgery, 9 of 21 major trauma patients and 8 of 10 septic

Table 1. Patient characteristics (n = 107).

Baseline characteristics	Mean (SD)	
Age (years)	60.03 (14.78)	
BMI (kg/m ²)	27.45 (5.64)	
Weight (kg)	81.49 (18.26)	
SAPS II	22.13 (9.63)	
ICU (days)	9.50 (14.05)	
Chronic kidney disease	18 (15%)	
Creatinine at admission ICU	1.13 (0.60)	
AKI	45 (42%)	
AKI stage 2 and 3	24 (22%)	
RRT <48 hours after admission	10 (9%)	
28-day mortality	10 (9%)	
Diagnosis/Surgery at admission	Frequency (percentage)	(IGFBP-7)*(TIMP-2) values (Median (IQR), min-max)
Hepatobiliary	12 (11%)	0.46 (0.30, 0.78), 0.22–1.78
Transplant	14 (13%)	0.45 (0.15, 1.50), 0.04–4.18
Cancer	13 (12%)	0.22 (0.11, 1.99), 0.02–9.50
Vascular	33 (31%)	0.27 (0.13, 0.36), 0.02–0.87
Severe Trauma	21 (20%)	0.38 (0.11, 1.27), 0.04–9.59
Sepsis	10 (9%)	1.24 (0.29, 2.83), 0.08–5.91
Other	4 (4%)	
(IGFBP-7)*(TIMP-2) values	Median (IQR), min-max	
∅ AKI	0.19 (0.10, 0.34), 0.02–1.79	
AKI Stage 1	0.51 (0.29, 2.29), 0.04–9.50	
AKI Stage 2 and 3	1.24 (0.56, 3.00), 0.32–9.59	
RRT <48 hours after admission	1.35 (0.76, 3.39), 0.44–4.18	

BMI, body mass index; SAPS II, Simplified Acute Physiology Score II; ICU, intensive care unit; AKI, acute kidney injury; RRT, renal replacement therapy; SD, standard deviation; IGF7, insulin-like growth factor-binding protein 7; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.t001

patients (Table 2). The median value of [TIMP-2]×[IGFBP7] in patients without AKI was 0.19 (IQR 0.1, 0.34); in patients with AKI stage 1: 0.51 (IQR 0.38, 2.66); 1.24 (IQR 0.56, 3.00) in patients with stage 2 and 3; and 1.35 (IQR 0.76, 3.39) in patients who subsequently received RRT. The RRT was started in the meantime of 22.06 hours (SD 14.8) after biomarker assessment and < 48 hours after ICU admission (in 5 patients due to refractory hyperkalemia, in 1 patient due to severe acidosis and in 4 patients due to oliguria < 0.3 ml/kg/h for > 24hours). The AUC for predicting AKI (all stages) was 0.85 (95% CI 0.78, 0.93) and 0.85 (95% CI 0.78, 0.92) for predicting AKI stage 2 and 3, 0.83 for the early use of RRT and 0.77 for 28-day mortality (95% CI 0.67, 0.80) (Fig. 2).

Bedside perioperative characteristics and postoperative clinical variables with and without the [TIMP-2]×[IGFBP7] test

Table 3 shows the performance of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test in combination with established perioperative risk factors for AKI, such as age, severity of illness score SAPS II, and

Table 2. Baseline characteristics of the study subgroups.

	Hepatic (n = 12)	Transplant (n = 14)	Cancer (n = 13)	Vascular (n = 33)	Trauma (n = 21)	Sepsis (n = 10)
Age	61.75 (SD 15.33)	54.50 (SD 11.31)	59.23 (SD 12.58)	64.55 (SD 9.42)	54.71 (SD 23.13)	64.30 (SD 9.66)
AKI yes	1 (8%)	6 (43%)	4 (31%)	16 (49%)	9 (43%)	8 (80%)
[TIMP2xIGFBP7]>0.3	9 (75%)	8 (57%)	5 (39%)	14 (42%)	13 (62%)	8 (80%)
SAPS II	15.58 (SD 8.68)	20.14 (SD 9.17)	18.90 (SD 4.83)	23.94 (SD 9.52)	23.71 (SD 8.14)	31.80 (SD 9.67)
Fluid balance (ml)	1419 (SD 1170)	1121 (SD 902)	939 (SD 1122)	1845 (SD 1265)	1518 (SD 1572)	2942 (SD 2698)
MAP (mmHg)	77.61 (SD 12.36)	81.32 (SD 11.82)	77.61 (SD 10.74)	78.61 (SD 8.09)	77.11 (SD 11.71)	76.99 (SD 5.09)
Hemoglobin (g/dl)	10.97 (SD 1.82)	9.57 (SD 1.52)	10.01 (SD 2.17)	9.80 (SD 1.60)	9.01 (SD 1.17)	9.14 (SD 1.38)
Urine Output (ml/kg/h)	1.28 (SD 0.64)	1.29 (SD 0.89)	1.47 (SD 0.72)	1.31 (SD 0.62)	1.68 (SD 0.84)	1.05 (SD 0.73)

Data are mean (SD) or n (%). Fluid 24 = Fluid balance in the first 24 hours after ICU admission; MAP = mean "mean arterial pressure" over the first 24 hours; Hemoglobin = mean hemoglobin level in the first 24 hours; Urine output = mean urine output ml/kg/h in first 24 hours.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.t002

creatinine level at ICU admission. Addition of biomarkers significantly improved the risk assessment of AKI; AUC increased from 0.72 (95% CI 0.62, 0.81) to 0.88 (0.82, 0.94), $p < 0.001$, and AKI Stage 2 and 3 AUC 0.81 (0.70, 0.90) improved to 0.87 (0.79, 0.95), $p < 0.001$.

Table 4 shows a multivariable logistic regression model with bedside postoperative parameters at the time of biomarker assessment alone and by adding the [TIMP-2]x[IGFBP7] test for predicting any AKI, AKI Stage 2 and 3, and the early use of RRT. By adding the [TIMP-2]x[IGFBP7] test to the postoperative clinical factors, the predictive power for AKI significantly improved ($P < 0.001$); AUC 0.81 (95% CI 0.73, 0.90) increased to 0.89 (95% CI 0.83, 0.96). Values for AKI Stage 2 and 3 were AUC 0.87 (95% CI 0.78, 0.96) increasing to 0.89 (95% CI 0.81, 0.97), $p = 0.002$. The same effect was observed for the use of RRT, for which AUC 0.85 (0.69, 1.00) increased to AUC 0.86 (0.73, 0.99) ($P = 0.035$).

Discussion

Our study evaluated the use of the novel urinary cell-cycle arrest biomarkers [TIMP-2]x[IGFBP7] in patients with a high risk of AKI (at least one additional risk factor according to the KDIGO recommendation [19]) after major non-cardiac surgery.

The mean findings of our study were: 1) In addition to good prediction for moderate and severe AKI, as showed in the validation study, we found that any AKI (including and excluding stage 1) can be predicted in non-cardiac surgery patients with a predefined cutoff of 0.3. 2) Compared to the Sapphire study¹⁶, in which biomarkers were tested up to 12 hours after admission, risk stratification in our study occurred very early after surgery within the mean time of 245 minutes. These results illustrate the rapid responsiveness of the test. 3) In the multivariable model with perioperative risk factors and bedside clinical parameters, [TIMP-2]x[IGFBP7] test was the strongest predictor and significantly improved the detection of surgical patients with an increased risk of AKI. 4) Early cell cycle arrest after surgery may be associated with adverse outcome. 5) Patients after hepatic surgery showed increased median values of biomarkers, and only one patient developed AKI within 48 hours after surgery. These findings suggest that the early correction of hypovolemia, which is routinely performed postoperatively in this group of patients, may reverse cell cycle arrest and prevent the development of AKI.

In the present study, higher median values of [TIMP-2]x[IGFBP7] after admission were associated with an increased degree of renal injury within 48 hours after surgery. Patients with AKI stage 1 had the lowest median values, and patients requiring RRT had the highest median [TIMP-2]x[IGFBP7] test results. This association was crucial and showed that the degree of

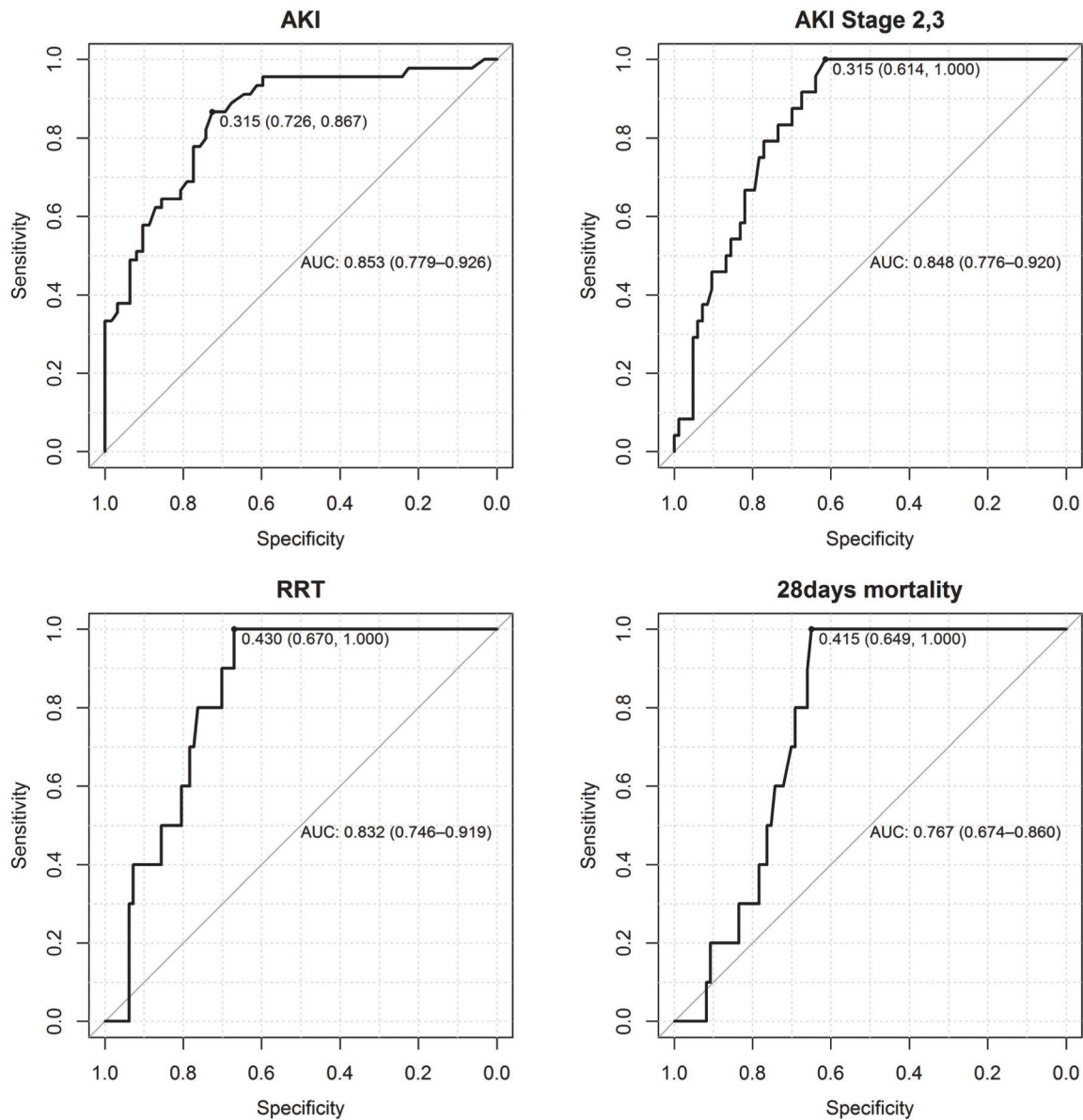


Fig 2. Area under the curve (AUC) and the best cut-offs for predicting AKI, AKI Stage 2 and 3, early use of RRT and 28-days mortality.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.g002

early cellular damage was associated with the severity of the functional defect occurring at a later stage.

Our results provide a new perspective on the performance of biomarkers in combination with perioperative parameters. Established risk factors for AKI are severity of the illness score, creatinine at admission, and age. In addition, we tested for the first time clinical parameters that help clinicians identify high-risk patients in the daily routine and that are associated with increased incidence or severity of AKI (urine output, hemoglobin level, mean arterial pressure, fluid balance, and use of vasopressors) [20–24]. In both models, use of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test significantly improved AKI prediction. Moreover, the AUC for predicting AKI with urinary biomarker alone was higher than the prediction with perioperative risk factors in both clinical models (0.85 for biomarker alone vs. 0.72 for perioperative and 0.81 for

Table 3. Multivariable logistic regression model of perioperative parameters at the time of biomarker assessment with and without the (TIMP-2)* (IGFBP7) for risk assessment of AKI, AKI Stage 2 and 3, RRT and 28-day mortality.

Variable	AKI		RRT		28 days mortality		AKI 2, 3	
	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value
Age (per year)	1.02 (0.98, 1.05)	.400	1.03 (0.97, 1.11)	0.332	1.01 (0.96, 1.06)	0.757	1.00 (0.96, 1.05)	0.865
SAPS II	1.08 (1.02, 1.14)	.013	1.14 (1.03, 1.25)	0.010	1.12 (1.02, 1.22)	0.014	1.13 (1.05, 1.21)	0.001
Creatinine (per 0.1 unit log)	1.09 (0.85, 1.36)	.528	0.78 (0.50, 1.23)	0.286	0.72 (0.45, 1.15)	0.165	0.84 (0.60, 1.17)	0.303
(IGFBP7) * (TIMP-2) level (per 0.1 unit log)	1.36 (1.19, 1.54)	<.001	1.13 (0.99, 1.30)	0.077	1.07 (0.94, 1.22)	0.283	1.23 (1.10, 1.38)	<0.001
AUC (95%-CI)	0.881 (0.817, 0.944)		0.893 (0.817, 0.969)		0.825 (0.710, 0.940)		0.868 (0.793, 0.944)	
AUC (95%-CI) without (IGFBP7) * (TIMP-2) level	0.715 (0.617, 0.813)		0.843 (0.731, 0.956)		0.799 (0.661, 0.937)		0.805 (0.709, 0.902)	
p-value*	<0.001		0.067		0.279		<0.001	

*Likelihood-ratio test (comparing the fit of both models)

AKI, acute kidney injury; RRT, renal replacement therapy; IGFBP7, insulin-like growth factor-binding protein 7; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase;

MAP, mean arterial pressure; AUC, area under the curve; CI, coincidence interval; OR, odds ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.t003

Table 4. Multivariable logistic regression model of bedside postoperative parameters at the time of biomarker assessment with and without the (TIMP-2)*(IGFBP7) for risk assessment of AKI, use of RRT, 28-days mortality and AKI 2,3.

Variable	AKI		RRT		28 days mortality		AKI stage 2, 3	
	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value	OR (95%-CI)	p-value
Urine Output (per 1ml/Kg/h)	0.38 (0.15, 0.96)	.041	0.19 (0.03, 1.17)	.073	0.92 (0.33, 2.56)	0.872	0.12 (0.03, 0.56)	0.007
MAP (per 1mmHg)	1.02 (0.97, 1.06)	.459	1.02 (0.96, 1.09)	.478	1.01 (0.95, 1.07)	0.838	1.02 (0.97, 1.08)	0.407
Hemoglobin (per 1g/dl)	0.94 (0.71, 1.23)	.640	1.02 (0.70, 1.50)	.909	0.85 (0.58, 1.26)	0.419	0.84 (0.61, 1.15)	0.276
Fluid (per 1000ml)	1.00 (0.52, 1.95)	.994	1.02 (0.57, 1.81)	.961	1.25 (0.74, 2.10)	0.399	1.02 (0.53, 1.96)	0.953
Norepinephrine (per 0.1µg/kg/min)	3.06 (1.42, 6.60)	.004	1.36 (0.87, 2.13)	.176	1.34 (0.89, 2.04)	0.166	2.37 (1.07, 5.25)	0.034
(IGFBP7) * (TIMP-2) level (per 0.1 unit log)	1.33 (1.17, 1.52)	<.001	1.17 (1.01, 1.36)	.043	1.10 (0.96, 1.15)	0.167	1.20 (1.07, 1.36)	0.003
AUC (95%-CI)	0.892 (0.829, 0.956)		0.858 (0.729, 0.986)		0.810 (0.693, 0.927)		0.892 (0.812, 0.973)	
AUC (95%-CI) without (IGFBP7) * (TIMP-2) level	0.811 (0.725, 0.897)		0.847 (0.694, 1.000)		0.754 (0.571, 0.936)		0.868 (0.775, 0.962)	
p-value*	<0.001		0.035		0.167		0.002	

*Likelihood-ratio test (comparing the fit of both models)

AKI, acute kidney injury; RRT, renal replacement therapy; IGFBP7, insulin-like growth factor-binding protein 7; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase; MAP, mean arterial pressure, AUC, area under the curve; CI, coincidence interval; OR, odds ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0120863.t004

bedside postoperative factors). Our results showed that the [TIMP-2]×[IGFBP7] test was the strongest predictor of AKI. Use of these biomarkers alone or in combination with established perioperative risk factors markedly improved early risk assessment.

The addition of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test to clinical models for assessing the risk of 28-days mortality improved prediction in both models (AUC from 0.76 to 0.81 and from 0.80 to 0.83 respectively). However, this association was statistically not significant. The median value of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test for patients dying within 28 days after surgery was lower than the median value for patients developing AKI stage 2–3 and for patients receiving RRT. This finding highlights the fact that the [TIMP-2]×[IGFBP7] test is primarily an AKI risk assessment tool. However, these findings support recent data suggesting that early cell cycle risk arrest in the kidneys may be associated with adverse outcome [25].

Interestingly, in the subgroup of patients after major hepatic surgery, relatively high median values of biomarkers of cellular injury contrasted with only one consecutive case of AKI within 48 hours after surgery. Application of a low CVP strategy is an effective and recommended method to reduce blood loss during liver surgery [26]. However, restrictive volume anesthesia is associated with an increased risk of acute renal failure in a postoperative setting [27]. Therefore, patients after liver resection are given higher amount of fluids in the early postoperative period to prevent prolonged perioperative hypoperfusion. In our study, the hepatic surgery subgroup had an unproportionally high mean positive fluid balance within first 24 hours postoperatively if compared to patients after cancer surgery with very similar baseline characteristics (1419 vs. 939 ml/24h). This fact may indirectly indicate that the early correction of hypovolemia may reverse early cell cycle arrest and prevent development of AKI.

Our study has several limitations. We conducted the study in one single surgical ICU. However, we believe that we examined a representative cohort of non-cardiac surgical patients. Our results showed higher rates of AKI (>42%) as well as early use of RRT (>10%). The high incidence of AKI – that may influence the predictive performance of biomarkers – was due to the study design that only included patients with a high risk of AKI. The previous two multicenter studies, however, have shown the ability of the [TIMP-2]×[IGFBP7] test to provide risk stratification for moderate and severe AKI in over 1100 critically ill patients with a prevalence of AKI, which was similar to that described in other literature reports. Moreover, another recent study has shown a very similar incidence of postoperative AKI of 39% in the cohort of 50 314 patients after major surgery [28]. Finally, we did not evaluate the long-term outcome (>28 days) in patients with cellular injury detected with [TIMP-2]×[IGFBP7] test. These issues need to be investigated in future studies.

In summary, we showed that the [TIMP-2]×[IGFBP7] test significantly improves the early prediction of any type of AKI in high-risk surgical patients. Due to its rapid responsiveness, the test extends the therapeutic window for renal protection measurements or future therapeutic interventions to prevent the development of AKI. Together with the known risk factors and bedside clinical parameters, this test helps clinicians more accurately identify patients who should consequently receive renal protective measures and escalation of care. Particularly postoperative hemodynamic optimization seems to decrease the risk of renal impairment in surgical patients [29]. This process could be started very early after surgery in patients with cellular stress diagnosed by means of urinary biomarkers. Future studies are required to determine whether early and more accurate risk stratification is consistently associated with better outcome for surgical patients with AKI.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IG BMG HJS TB. Performed the experiments: IG MK. Analyzed the data: FZ IG PR MHD MN JK HJS. Wrote the paper: IG MK PR MHD HJS JK TB.

References

1. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med*. 2008; 36:S146–51 doi: [10.1097/CCM.0b013e318168c590](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318168c590) PMID: [18382186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18382186/)
2. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, et al. (2013) Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013; 8(9):1482–932. doi: [10.2215/CJN.00710113](https://doi.org/10.2215/CJN.00710113) PMID: [23744003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23744003/)
3. Bihorac A, Yavas S, Subbiah S, Hobson CE, Schold JD, Gabrielli A, et al. Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg*. 2009; 249(5):851–8 doi: [10.1097/SLA.0b013e3181a40a0b](https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181a40a0b) PMID: [19387314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19387314/)
4. White LE, Hassoun HT, Bihorac A, Moore LJ, Sailors RM, McKinley BA, et al. Acute kidney injury is surprisingly common and a powerful predictor of mortality in surgical sepsis. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013; 75(3):432–8 doi: [10.1097/TA.0b013e31829de6cd](https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31829de6cd) PMID: [24089113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24089113/)
5. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;(Epub ahead of print)
6. Kim CS, Oak CY, Kim HY, Kang YU, Choi JS, Bae EH, et al. Incidence, predictive factors, and clinical outcomes of acute kidney injury after gastric surgery for gastric cancer. *PLoS One* 2013; 9; 8(12)
7. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, Ronco C, Endre Z, Kellum JA, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*. 2015; 85(3):513–21.
8. Haase M, Kellum JA, Ronco. AKI—an emerging syndrome with important consequences. *Nat Rev Nephrol*. 2012; 8(12):735–9. doi: [10.1038/nrneph.2012.197](https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.197) PMID: [23007617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23007617/)
9. Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2009; 76(6):604–13 doi: [10.1038/ki.2009.224](https://doi.org/10.1038/ki.2009.224) PMID: [19536080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19536080/)
10. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2014; 337:1–13 doi: [10.1182/asheducation-2014.1.337](https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.337) PMID: [25696876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25696876/)
11. Seo DW, Li H, Qu CK, Oh J, Kim YS, Diaz T, et al. Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006; 281:3711–3721. PMID: [16326706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16326706/)
12. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35:7475–7484 PMID: [17942417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942417/)
13. Yang QH, Liu DW, Long Y, Liu HZ, Chai WZ, Wang XT. Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation. *J Infect*. 2009; 58:459–464 doi: [10.1016/j.jinf.2009.04.003](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.04.003) PMID: [19428114](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19428114/)
14. Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP- independent mechanism. *Cell*. 2003; 114:171–180 PMID: [12887919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887919/)
15. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008; 132:363–374 doi: [10.1016/j.cell.2007.12.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.032) PMID: [18267069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267069/)
16. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, Artigas A, Bagshaw SM, Bell M, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care*. 2013;6: 17(1)
17. Bihorac A, Chawla LS, Shaw AD, Al-Khafaji A, Davison DL, Demuth GE et al. Validation of Cell-Cycle Arrest Biomarkers for Acute Kidney Injury Using Clinical Adjudication. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;Feb 21. [Epub ahead of print]
18. Meersch M, Schmidt C, Van Aken H, Martens S, Rossaint J, Singbartl K, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS One*. 2014; 9(3).
19. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, Barsoum RS, Burdmann EA, Goldstein SL, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury 2012. *Kidney Int*. 2012; suppl 2(1):1–138.
20. Macedo E, Malhotra R, Bouchard J, Wynn SK, Mehta RL. Oliguria is an early predictor of higher mortality in critically ill patients. *Kidney Int*. 2011; 80(7):760–7 doi: [10.1038/ki.2011.150](https://doi.org/10.1038/ki.2011.150) PMID: [21716258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21716258/)

21. RENAL Replacement Therapy Study Investigators, Bellomo R, Cass A, Cole L, Finfer S, Gallagher M, et al. An observational study fluid balance and patient outcomes in the Randomized Evaluation of Normal vs. Augmented Level of Replacement Therapy trial. *Crit Care Med*. 2012; 40(6):1753–60 doi: [10.1097/CCM.0b013e318246b9c6](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318246b9c6) PMID: [22610181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610181/)
22. Bartels K, Karhausen J, Clambey ET, Grenz A, Eltzschig HK. Perioperative organ injury. *Anesthesiology*. 2013; 119(6):1474–89. doi: [10.1097/ALN.0000000000000022](https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000022) PMID: [24126264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24126264/)
23. Walsh M, Garg AX, Devereaux PJ, Argalious M, Honar H, Sessler DI. The association between perioperative hemoglobin and acute kidney injury in patients having noncardiac surgery. *Anesth Analg*. 2013; 117(4):924–31. doi: [10.1213/ANE.0b013e3182a1ec84](https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182a1ec84) PMID: [24023017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24023017/)
24. Asfar P, Meziani F, Hamel JF, Grelon F, Megarbane B, Anguel N, et al. High versus low blood-pressure target in patients with septic shock. *N Engl J Med*. 2014;24; 370(17)
25. Murugan R., Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7(4), 209–217 doi: [10.1038/nrneph.2011.13](https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.13) PMID: [21343898](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21343898/)
26. Jones RM, Moulton CE, Hardy KJ. Central venous pressure and its effect on blood loss during liver resection. *Br J Surg*. 1998; 85(8):1058–60. PMID: [9717995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9717995/)
27. Spolverato G, Ejaz A, Hyder O, Kim Y, Pawlik TM. Failure to rescue as a source of variation in hospital mortality after hepatic surgery. *Br J Surg*. 2014; 101(7):836–46. doi: [10.1002/bjs.9492](https://doi.org/10.1002/bjs.9492) PMID: [24760705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24760705/)
28. Hobson C, Ozrazgat-Baslanti T, Kuxhausen A, Thottakkara P, Efron PA, Moore FA et al. Cost and Mortality Associated With Postoperative Acute Kidney Injury. *Ann Surg*. 2014; [Epub ahead of print]
29. Brienza N, Giglio MT, Marucci M, Fiore T. Does perioperative hemodynamic optimization protect renal function in surgical patients? A meta-analytic study. *Crit Care Med*. 2009; 37(6):2079–90 doi: [10.1097/CCM.0b013e3181a00a43](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a00a43) PMID: [19384211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19384211/)