

I biomarcatori di danno renale acuto

Sara Samoni¹, Silvia De Rosa², Claudio Ronco^{3,4}

¹Dipartimento di Nefrologia e Dialisi, ASST Lariana, Ospedale S. Anna, Como

²Dipartimento di Anestesia e Rianimazione, Ospedale San Bortolo, Vicenza

³International Renal Research Institute Vicenza (IRRV), Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto Renale, Ospedale San Bortolo, Vicenza

⁴Dipartimento di Medicina (DIMED), Università di Padova, Padova

ABSTRACT

Biomarkers of acute kidney injury.

The diagnosis and follow-up of acute kidney injury (AKI) has traditionally been based on clinical parameters such as urine output, and/or biomarkers such as serum creatinine (sCr), which are not very sensitive. The identification and validation of novel biomarkers, capable of recognizing an increased risk of AKI, a renal damage before or without a functional renal loss (i.e. subclinical AKI) and a renal dysfunction prior to the increase in sCr levels, has reviewed the diagnosis and classification of AKI. Thanks to these biomarkers, a new conceptual model of AKI, that includes the full spectrum of events and conditions, has been developed. At each stage of this model, biomarkers may contribute to explain the mechanisms and to predict the clinical evolution of kidney damage. Several biomarkers have been identified. They differ in anatomical origin, physiological function, kinetics and detecting time after kidney injury. The present review describes the main biomarkers' characteristics and their role in the clinical practice.

Parole chiave: creatinina sierica, danno renale, biomarcatori

INTRODUZIONE

Il danno renale acuto (AKI, acute kidney injury) è una sindrome da disfunzione multiorganica caratterizzata da una riduzione improvvisa ma reversibile della funzione renale e del filtrato glomerulare (GFR, glomerular filtration rate) e si manifesta tradizionalmente con l'incremento della creatinemia (sCr, serum creatinine), dell'azotemia e/o con la riduzione della diuresi. La sua incidenza è in aumento, soprattutto nei pazienti ospedalizzati e ancor più nei pazienti critici ricoverati in terapia intensiva (ICU, intensive care unit). Infatti, la malattia critica, insieme all'età avanzata e ad altre comorbidità, tra cui la malattia renale cronica (CKD, chronic kidney disease), aumenta la suscettibilità renale all'esposizione a tossici e all'ipoperfusione, determinando un'aumentata incidenza di AKI in questi pazienti (1). Allo stesso tempo, l'AKI è un importante fattore di rischio di CKD e di progressione verso l'insufficienza renale cronica terminale (ESRD, End-Stage Renal Disease) (2,3). Anche per questo, la prevenzione dell'AKI e il suo trattamento precoce, finalizzato alla reversibilità del

danno d'organo, è uno dei principali obiettivi della ricerca clinica in questo ambito. Purtroppo, ad oggi la definizione, e quindi la diagnosi, di AKI si basa sul criterio clinico della diuresi e sulla variazione della sCr, parametro tutt'altro che precoce (4). Tuttavia, oggi una diagnosi precoce di AKI è possibile in diverse situazioni cliniche grazie all'impiego dei più recenti biomarcatori di danno renale i cui livelli variano prima che aumenti la sCr e anche prima che sia evidente una perdita funzionale renale, cioè allo stadio di AKI subclinica (5,6). In altre parole, con l'introduzione dei recenti biomarcatori di danno renale, l'AKI (precedentemente basata unicamente sulla riduzione acuta della funzionalità renale, "disfunzione renale") è stata ulteriormente arricchita da informazioni sul danno d'organo precoce e concomitante ("danno renale") e sulla sua risoluzione, permettendo una più puntuale descrizione del *continuum* che va da un rene normale sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. In ciascuna di queste fasi, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale (Figura 1).

Corrispondenza a: Sara Samoni, Dipartimento di Nefrologia e Dialisi, ASST Lariana, Ospedale S. Anna, via Ravona 20, 22020 San Fermo della Battaglia (CO), Italia, Telefono +39 031 5859516, E-mail sarasamoni1@gmail.com

Ricevuto: 29.12.2020

Revisionato: 25.01.2021

Accettato: 18.02.2021

Pubblicato on-line: 29.03.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.011

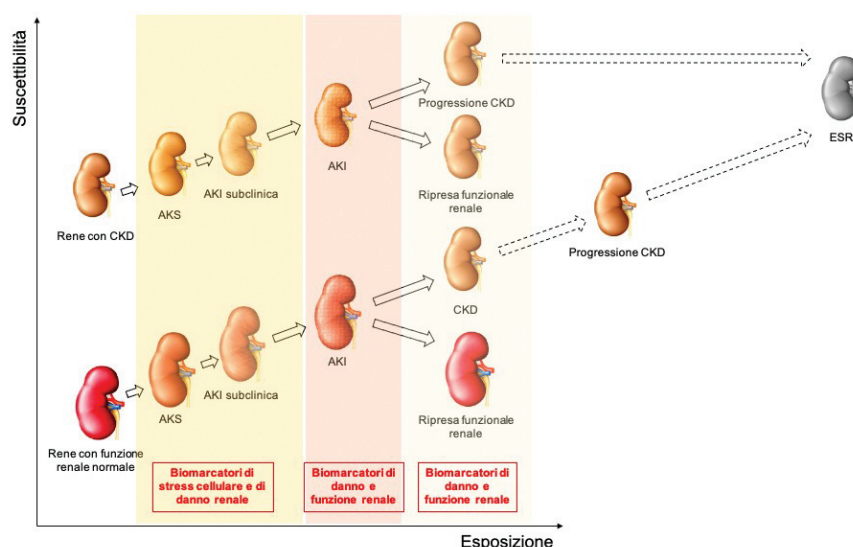


Figura 1

Continuum del danno renale acuto. Possibili stadi dell'AKI a partire da un rene sano o da un rene precedentemente compromesso, sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. La malattia renale cronica aumenta la suscettibilità renale all'esposizione a tossici e all'ipoperfusione, determinando un'aumentata incidenza di AKI in questi pazienti. In ciascuna di queste fasi, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale. AKI, danno renale acuto; AKS, Stress renale acuto; CKD, malattia renale cronica; ESRD, insufficienza renale cronica terminale; GFR, velocità di filtrazione glomerulare.

La presente rassegna descrive i principali biomarcatori di AKI, distinguendo tra marcatori di stress, danno e funzione renale, il loro principale utilizzo nella pratica clinica e le prospettive future.

Dal danno renale acuto clinico al subclinico

Fino ai primi anni del 2000, la comunità scientifica internazionale si riferiva al danno renale acuto utilizzando definizioni diverse e disomogenee che non consentivano una trattazione uniforme del problema né in termini clinici né di ricerca. Nel 2002 il gruppo di consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI), riunitosi a Vicenza, propose la prima definizione univoca di AKI e la sua stadiazione secondo i criteri RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, and End stage renal disease) che consideravano vari gradi di gravità della sindrome, da modesti incrementi della sCr e/o iniziali riduzioni della diuresi sino a forme gravi e conclamate (7). I criteri RIFLE furono convalidati su circa 2 milioni di pazienti e fu dimostrato che, con il progredire della gravità della sindrome in base a tali stadi, aumentava progressivamente la mortalità (8–10). Nel 2007 e nel 2012, i criteri RIFLE furono modificati prima dall'Acute Kidney Injury Network (AKIN) (11) e successivamente dal gruppo di lavoro Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) (4) fino ad arrivare all'attuale definizione di AKI e ai criteri attualmente utilizzati per la sua diagnosi e stadiazione. Tutte queste definizioni, inclusa quella attualmente in uso, si basano sull'espressione funzionale del danno renale ("disfunzione renale") a sua volta identificata con l'aumento della sCr e/o con la riduzione della diuresi. Tuttavia, la sCr, che è ancora oggi il biomarcatore più

utilizzato per misurare la funzione renale, è un indice imperfetto e tardivo di danno renale, iniziando a variare solo in caso di compromissione di più della metà dei nefroni (12), ed essendo inficiata dalla perdita di massa muscolare (13,14) e dall'iperidratazione (15–17), entrambe evenienze comuni in ambito ospedaliero e soprattutto in area critica, dove è più alta l'incidenza di AKI. Se nell'ambito della CKD, per superare queste limitazioni, sono state proposte delle formule per la stima del GFR, queste risultano tuttavia imprecise in alcune categorie di pazienti (18,19) e non sono convalidate, e quindi utilizzabili, nei pazienti con AKI (12). Infine, in merito al criterio clinico della diminuzione della diuresi, è noto che non sempre il danno renale si esprime con l'oligo-anuria. Pertanto, gli attuali criteri diagnostici di AKI non sono appropriati per la diagnosi precoce di danno né di ripresa funzionale renale.

Inoltre, l'AKI è un processo dinamico che, accanto alle alterazioni funzionali sopradescritte, indicative di "disfunzione renale", può determinare l'espressione di una serie di biomarcatori indicativi di "danno renale". Per questo, nel 2012 il gruppo ADQI ha riconsiderato la diagnosi di AKI includendo sia i biomarcatori di funzione che di danno renale; questi ultimi possono modificarsi prima che vi sia una perdita di funzione renale o anche in assenza di questa, definendo, in questo caso, un'entità denominata AKI subclinica. L'AKI subclinica include, quindi, quei casi in cui non vi sono i criteri minimi nemmeno per la diagnosi di AKI stadio 1, pur in presenza di un danno renale identificato dall'aumento dei biomarcatori, cosiddetti precoci, di danno renale. Solo se il danno prodotto è esteso e/o prolungato nel tempo

Tabella 1

Confronto dei criteri di classificazione RIFLE, AKIN e KDIGO con i recenti criteri di consenso ADQI per la diagnosi e stadiazione del danno renale acuto.

ESPRESSIONE FUNZIONALE DEL DANNO RENALE					
STADIAZIONE	sCr, GFR, eGFR			DIURESIS	Biomarcatori Precoci
	RIFLE	AKIN	KDIGO		ADQI
Stadio 1S (ADQI)	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Stadio 1S: biomarcatori precoci positivi
Risk (RIFLE)	Aumento della sCr x 1,5 dal valore basale	Aumento della sCr x 1,5-2 dal valore basale, oppure	Aumento della sCr x 1,5-1,9 dal valore basale, oppure	<0,5 mL/kg/h per 6-12h	Stadio 1A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 1 (AKIN e KDIGO)	oppure diminuzione del GFR >25%	aumento della sCr ≥0,3 mg/dL (≥26,5 μmol/L)	aumento della sCr ≥0,3 mg/dL (≥26,5 μmol/L)		Stadio 1B: biomarcatori precoci positivi
Injury (RIFLE)	Aumento della sCr x 2 dal valore basale	Aumento della sCr > x 2-3 dal valore basale	Aumento della sCr x 2-2,9 dal valore basale	<0,5 mL/kg/h per 6-12h	Stadio 2A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 2 (AKIN e KDIGO)	oppure diminuzione del GFR >50%				Stadio 2A: biomarcatori precoci positivi
Failure (RIFLE)	Aumento della sCr x 3 dal valore basale	Aumento della sCr >x 3 dal valore basale, oppure	Aumento della sCr ≥x 3 dal valore basale, oppure	<0,3 mL/kg/h per ≥24h, oppure anuria per ≥12h	Stadio 3A: biomarcatori precoci negativi
Stadio 3 (AKIN e KDIGO)	sCr >4 mg/dL (>354 μmol/L) con aumento dal valore basale >0,5 mg/dL (>44 μmol/L), oppure diminuzione del GFR >50%	sCr ≥4 mg/dL (≥354 μmol/L) con un aumento dal valore basale >0,5 mg/dL (>44 μmol/L), oppure inizio CRRT	sCr ≥4 mg/dL (≥354 μmol/L), oppure inizio CRRT, oppure in età <18 anni, diminuzione eGFR <35 mL/min/1,73 m ²		Stadio 1B: biomarcatori precoci positivi
Loss (RIFLE)	Perdita completa della funzione renale per più di 4 settimane	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto
ESRD (RIFLE)	End Stage Renal Disease >3 mesi	Non previsto	Non previsto	Non previsto	Non previsto

sCr, creatinina sierica; GFR, velocità di filtrazione glomerulare; eGFR, velocità di filtrazione glomerulare stimata; RIFLE, Risk-Injury-Failure-Loss-End stage renal disease; AKIN, Acute Kidney Injury Network; KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcome; ADQI, Acute Dialysis Quality Initiative; CRRT, Continuous Renal Replacement Therapy

(tanto da superare la riserva funzionale renale del paziente), la conseguente riduzione del GFR si manifesta clinicamente con una variazione diagnostica della sCr e/o della diuresi (20). Nel 2020, lo stesso gruppo di consenso ha proposto di modificare lo stadio 1 e gli stadi 2 e 3 di AKI definiti dai criteri KDIGO, suddividendoli, rispettivamente, in 3 sotto-stadi (AKI 1S, AKI 1A e AKI 1B) e in 2 sotto-stadi (AKI 2A, AKI 2B e AKI 3A, AKI 3B), in base alla positività o meno dei biomarcatori. In particolare, lo stadio 1S identifica una fase iniziale in cui il danno renale è documentato dalla positività dei

biomarcatori precoci in assenza di aumento della sCr e/o di riduzione della diuresi. Gli stadi 1A, 2A e 3A includono i pazienti in cui sono soddisfatti i criteri KDIGO per la diagnosi di AKI di stadio, rispettivamente 1, 2 e 3, senza un aumento significativo dei biomarcatori precoci. Infine, negli stadi 1B, 2B e 3B, vi è la contemporanea presenza dei criteri KDIGO per la diagnosi di AKI di stadio, rispettivamente 1, 2 e 3 e della positività dei biomarcatori (Tabella 1) (21). La necessità di tale modifica origina dall'osservazione che, al pari dell'AKI clinica, anche l'AKI subclinica si associa ad outcome peggiori (6,22). Per

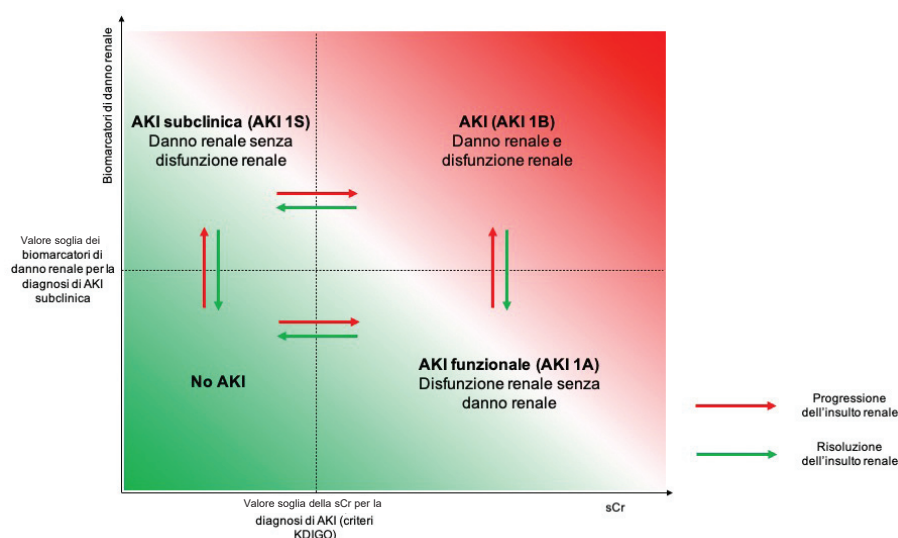


Figura 2

Modello concettuale di danno/disfunzione renale acuta.

Il gruppo di consenso Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) ha riconsiderato la diagnosi di danno renale acuto includendo sia i biomarcatori di funzione che di danno renale e ha individuato 4 possibili quadri. Sull'asse delle ascisse è riportato l'andamento dei valori della creatinina sierica, mentre sull'asse delle ordinate quello dei biomarcatori di danno renale. Le linee tratteggiate verticale e orizzontale rappresentano, rispettivamente, il valore soglia della creatinina sierica per la diagnosi di danno renale acuto secondo i criteri KDIGO e il valore soglia dei biomarcatori per la diagnosi di danno renale acuto subclinico. Il superamento dei valori soglia determina il passaggio da uno all'altro dei 4 possibili quadri identificati.

- in basso a sinistra, "no AKI": biomarcatori di danno renale inferiori al valore soglia e assenza dei criteri minimi KDIGO per la diagnosi di danno renale acuto;
- in basso a destra, "AKI 1A" (disfunzione renale senza danno renale): biomarcatori di danno renale inferiori al valore soglia, e presenza di criteri minimi KDIGO per la diagnosi di AKI;
- in alto a sinistra, "AKI subclinica" o "AKI 1S" (danno renale senza disfunzione renale): biomarcatori di danno renale superiori al valore soglia e assenza dei criteri minimi KDIGO per la diagnosi di AKI;
- in alto a destra, "AKI" o "AKI 1B" (danno renale e disfunzione renale): biomarcatori di danno renale superiori ai valori soglia e presenza dei criteri KDIGO per la diagnosi di AKI.

Le frecce rosse indicano la progressione del danno renale dovuta all'esposizione ex novo o protratta, ad agenti nefrotossici. Le frecce verdi indicano il miglioramento del danno renale grazie alla risoluzione dell'insulto renale.

AKI, danno renale acuto; KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcome; sCr, serum creatinine

questo e poiché un'identificazione e un conseguente approccio terapeutico precoce può prevenire o limitare lo sviluppo di AKI, il gruppo ADQI ha suggerito l'utilizzo, nella pratica clinica, dei biomarcatori precoci di stress, danno e disfunzione renale. La classificazione di un paziente in stadio 1S o 1A, ovvero in uno stadio estremamente precoce e quindi potenzialmente reversibile di danno/disfunzione renale, è di grande utilità clinica. Infatti, a fronte di una sostanziale carenza di terapie efficaci in caso di AKI conclamata, le strategie preventive per arrestare o ridurre la progressione del danno renale sono diverse e di convalidata efficacia (monitoraggio e ottimizzazione dello stato emodinamico, limitazione/sospensione degli agenti nefrotossici, e così via.) (4) (Figura 2).

I biomarcatori identificati e utilizzati a scopo clinico e/o di ricerca sono numerosi e differiscono tra loro per origine anatomica, funzione fisiologica, cinetica e tempo di picco. Questi sono in genere proteine prodotte dall'epitelio tubulare o da cellule infiammatorie migrate nel tubulo durante un insulto parenchimale, ovvero molecole a basso peso molecolare fisiologicamente filtrate

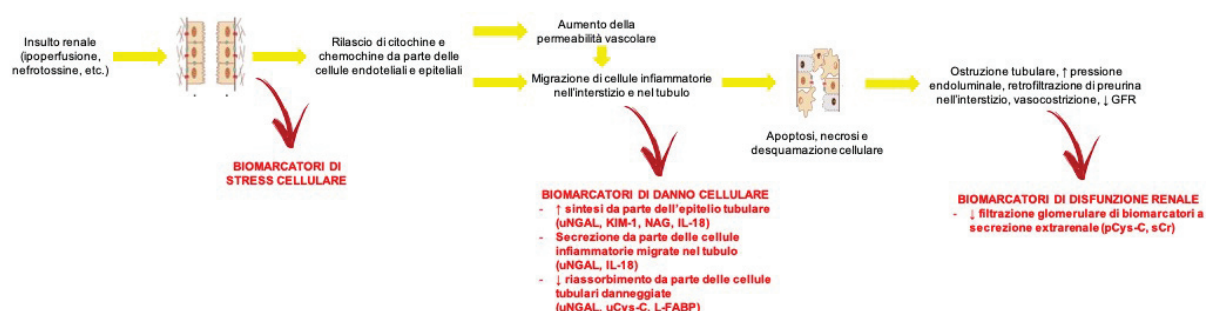
attraverso la barriera glomerulare e non più riassorbite dal tubulo renale danneggiato e sono espressione di un danno renale; ovvero molecole che, pur piccole, non vengono più filtrate liberamente dal glomerulo per una riduzione del GFR, accumulandosi nel sangue ed esprimendo quindi una disfunzione renale. Vi sono, infine, i più recenti biomarcatori di arresto del ciclo cellulare che sono in grado di valutare lo stress cellulare non solo prima della disfunzione, ma anche del danno renale e che stanno dando risultati promettenti (Figura 3). Nella Tabella 2 sono elencati i principali biomarcatori, le loro caratteristiche e il loro significato clinico.

BIOMARCATORI DI DANNO RENALE ACUTO

Biomarcatori di danno renale

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

NGAL è una glicoproteina di 25 kDa secreta dai neutrofili in risposta alle infezioni batteriche (23,24). Una volta secreta, NGAL lega i siderofori prodotti dai batteri e impedisce l'approvvigionamento di ferro necessario

**Figura 3**

Biomarcatori di stress, danno e disfunzione renale.

Un qualsiasi insulto renale (ischemico, nefrotossico) induce la secrezione di citochine e chemochine da parte delle cellule endoteliali e tubulari. Le chemochine determinano la migrazione di cellule infiammatorie nell'interstizio e nel tubulo interessato dall'insulto renale. Anche le citochine, mediante l'induzione di un'aumentata permeabilità vascolare, contribuiscono a richiamare cellule infiammatorie nel sito di danno. In entrambi i casi, i globuli bianchi si radunano nel lume e nell'interstizio renale determinando apoptosi e necrosi cellulare e conseguente desquamazione cellulare. Questo causa ostruzione tubulare, aumento della pressione endoluminale e retrofiltrazione di preurina nell'interstizio, vasocostrizione e riduzione della filtrazione glomerulare. I biomarcatori di stress cellulare, che indicano un aumentato rischio di danno renale acuto aumentano poche ore dopo l'insulto renale. I biomarcatori di danno renale acuto aumentano appunto in seguito a danno renale e hanno una diversa origine; infatti, possono essere prodotti dall'epitelio tubulare danneggiato, o non riassorbiti dallo stesso, o ancora, possono essere secreti dalle cellule infiammatorie migrate nel tubulo. I biomarcatori di disfunzione renale hanno una produzione extrarenale e aumentano nel sangue per ridotta filtrazione glomerulare. GFR, velocità di filtrazione glomerulare; IL-18, Interleukin-18; KIM-1, Kidney injury molecule-1; L-FABP, Liver fatty acid-binding protein; NAG, N-Acetyl-β-D-glucosamine; pCys-C, plasma Cystatin C; sCr, serum creatinine; uCys-C, urinary Cystatin C; uNGAL, urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

Tabella 2

Caratteristiche e significato dei principali biomarcatori renali.

Biomarcatore	Produzione e clearance renale	Campione	Tempo di rilevamento dopo insulto renale	Significato
uNGAL	È filtrato dal glomerulo e riassorbito dal tubulo prossimale. È secreto dal tubulo distale in corso di danno renale. In questo caso, aumenta nelle urine per secrezione e ridotto riassorbimento da parte del tubulo.		2-4h	
NAG	Non è filtrato dal glomerulo. È rilasciato dal tubulo in caso di danno renale e di aumentata attività lisosomiale.		12h	
KIM-1	Il suo dominio extracellulare è secreto nelle urine in caso di danno renale.	urine	12-24h	Danno renale
L-FABP	L-FABP è secreto dal tubulo prossimale nelle urine in risposta. A diversi stimoli, tra cui il danno renale.		1h	
IL-18	È rilasciata nelle urine dai neutrofili attivati migrati nel tubulo.		6-24h	
uCys-C	È filtrata dal glomerulo e riassorbita dal tubulo prossimale. Aumenta nelle urine a seguito di danno renale per ridotto riassorbimento tubulare.		12-24h	
pNGAL	È filtrata dal glomerulo. Aumenta per ridotta filtrazione in caso di disfunzione renale.	sangue	2-4h	Disfunzione renale
pCys-C	È filtrata dal glomerulo. Aumenta per ridotta filtrazione in caso di disfunzione renale.		12-24h	
TIMP-2	Up-regolati e rilasciati nelle urine durante le fasi iniziali del danno cellulare del tubulo prossimale.	urine	Non disponibile	Stress tubulare
IGFBP7				

uNGAL, urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NAG, N-Acetyl-β-D-glucosamine; KIM-1, Kidney injury molecule-1; L-FABP, Liver fatty acid-binding protein; IL-18, Interleukin-18; uCys-C, urinary Cystatin C; pCys-C, pNGAL, plasma Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; plasma Cystatin C; TIMP-2, Tissue inhibitor of metalloproteinase 2; IGFBP7, Insulin-like growth factor-binding protein 7.

alla loro crescita, agendo di fatto come un agente batteriostatico endogeno (25). NGAL è stata rinvenuta in numerosi tessuti, tra cui quello polmonare, gastrico e renale (26) e la sua secrezione è stata correlata a diverse condizioni patologiche (27). Il ruolo biologico di NGAL sul rene potrebbe essere quello di limitare la tossicità ferro-mediata in una fase precoce di danno renale e di favorire il trasporto di ferro alle cellule inducendo la differenziazione delle cellule progenitrici renali in cellule dell'epitelio tubulare in una fase tardiva, partecipando, quindi, al processo di riparazione dopo un episodio di AKI (28). NGAL viene liberamente filtrata dal glomerulo e riassorbita a livello del tubulo prossimale renale. In risposta ad un insulto renale, NGAL viene rapidamente secreta dalle cellule dell'epitelio tubulare distale sia in direzione apicale che baso-laterale, determinando un aumento della sua concentrazione urinaria e plasmatica. In corso di danno renale, la concentrazione urinaria di NGAL aumenta anche come conseguenza del mancato riassorbimento tubulare da parte del tubulo prossimale danneggiato. In corso di AKI, la concentrazione plasmatica di NGAL aumenta per riduzione della sua filtrazione glomerulare (29).

Dopo il riscontro di alti livelli di NGAL nel plasma, nelle urine (28) e nei preparati biotici renali di pazienti con AKI, numerosi studi, condotti in diversi contesti clinici, ne hanno indagato il potenziale ruolo come biomarcatore precoce di AKI (30). Questi hanno descritto il valore predittivo positivo e negativo di NGAL in merito alla diagnosi e alla stadiazione di AKI, al sito di danno, alla necessità di terapia renale sostitutiva (RRT, renal replacement therapy) e di ripresa funzionale renale o di progressione verso la CKD (31). Purtroppo, i livelli di NGAL aumentano non solo nell'AKI, ma anche in presenza di altre patologie come la sepsi (32), il diabete mellito (33), la CKD (34) e nella circolazione extracorporea (35). Inoltre, data la varietà dei meccanismi fisiopatologici dell'AKI e dei contesti clinici in cui questa può verificarsi, questi studi presentano un alto grado di eterogeneità, limitando la possibilità di meta-analisi che giungano a conclusioni significative. Una soluzione è identificare un cluster di meccanismi di AKI o di ambiti clinici che possono permettere di migliorare l'omogeneità dei dati analizzati e arrivare a conclusioni utili almeno all'interno di popolazioni selezionate. In linea con questo approccio, una meta-analisi di Zhang et al., ha concluso che i livelli di NGAL (sia urinari che plasmatici) predicono AKI, necessità di RRT e mortalità nei pazienti settici (36). De Geus et al. hanno studiato il ruolo di NGAL nei pazienti cardiocirurgici, documentando come, anche in questa popolazione, NGAL sia un buon indicatore predittivo di AKI. Gli stessi autori hanno elaborato uno score, definito "NGAL score", al fine di identificare i valori soglia e le loro variazioni significative sia nel plasma che nelle urine; il punteggio contiene livelli ben definiti di NGAL utili ad escludere AKI o a quantificare il livello di danno a livello tubulare (37). Attualmente, sono in corso numerosi studi mirati ad indagare il valore predittivo di NGAL nella diagnosi e nella prognosi di AKI in ulteriori contesti clinici.

N-Acetyl-β-D-glucosamine (NAG)

NAG è un enzima lisosomiale di oltre 130 kDa rinvenuto in molte cellule umane tra cui quelle del tubulo prossimale renale. Agisce come glucosidasi e catalizza l'idrolisi del residuo terminale di glucosio delle glicoproteine (38). Dato l'alto peso molecolare, NAG non viene filtrato dal glomerulo, pertanto tutto il NAG rilevato nelle urine ha origine tubulare. I livelli urinari di NAG aumentano in corso di danno cellulare renale, ma anche di aumentata attività lisosomiale in corso di nefropatia diabetica, malattia glomerulare cronica e ripresa ritardata della funzione renale dopo trapianto (39).

Alcuni studi hanno investigato il valore predittivo di AKI, di necessità di RRT e di mortalità, di NAG in diverse popolazioni (40,41) e altri sono ad ora in corso.

Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

KIM-1 è una glicoproteina transmembrana di 104 kDa presente sul versante apicale delle cellule del tubulo contorto prossimale. In risposta ad un danno tubulare renale, il suo dominio extracellulare viene separato dal dominio transmembranario per proteolisi enzimatica e rilasciato nelle urine (42). KIM-1 e il suo dominio solubile sembrano avere un ruolo nei processi di rigenerazione tubulare (30).

In condizioni normali, KIM-1 non è misurabile nelle urine, ma aumenta dopo necrosi tubulare acuta. Sebbene gli studi su modelli animali abbiano dato risultati molto promettenti (43), i risultati degli studi clinici non sono stati, invece, uniformi (40,44). Sono in corso ulteriori studi volti a chiarire il ruolo predittivo di KIM-1, da solo o inserito in un pannello con altri biomarcatori, nella diagnosi e nella prognosi di AKI.

Liver fatty acid-binding protein (L-FABP)

L-FABP è una proteina legante gli acidi grassi di circa 14 kDa sintetizzata dal fegato, dall'intestino e dall'epitelio del tubulo renale prossimale. La sua funzione è di legare gli acidi grassi e trasportarli ai mitocondri e ai perossisomi; legandosi ai prodotti dell'ossidazione lipidica, protegge le cellule renali dallo stress ossidativo (45). L-FABP è localizzata nel tubulo prossimale ed è secreta nelle urine in risposta a diversi stimoli, come la proteinuria, l'ipossia, l'iperglicemia, l'ipertensione e lo stress ossidativo (46). Sembra essere un promettente biomarcatore per la diagnosi precoce e la prognosi di AKI nei pazienti critici (47,48).

Interleukin-18 (IL-18)

IL-18 è una citochina proinfiammatoria di 22 kDa prodotta dai macrofagi e dalle cellule tubulari renali. Interviene in diversi processi patologici renali, quali il danno da ischemia/riperfusion, il rigetto, i disordini autoimmuni (30).

Tra i biomarcatori proposti, sembra essere, insieme ad NGAL, il più sensibile nella diagnosi precoce di AKI nei pazienti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia

(49). Il suo ruolo è allo studio anche per la diagnosi precoce di AKI da mezzo di contrasto. Purtroppo, IL-18 non aumenta solo nell'AKI, ma anche in numerose altre condizioni patologiche, quali la sepsi, l'endotossinemia e nelle malattie infiammatorie e autoimmuni.

Urinary cystatin C (uCys-C)

Cys-C è un inibitore della cisteina proteasi, di 13 kDa sintetizzato da tutte le cellule nucleate. Viene liberamente filtrata dal glomerulo ed è quasi completamente riassorbita nel tubulo prossimale per endocitosi recettore-mediata, tanto che, in condizioni normali, è rilevata nelle urine solo in minima quantità. A seguito di un danno renale e della conseguente riduzione del riassorbimento tubulare, la concentrazione di Cys-C nelle urine aumenta (30).

uCys-C sembra avere un buon valore predittivo di necessità di RRT nei pazienti con AKI in ICU (50). Purtroppo, Cys-C e albumina competono nel riassorbimento tubulare (51), riducendo così la sensibilità dei livelli di uCys-C nella diagnosi e nella prognosi dell'AKI in tutte le condizioni cliniche associate ad albuminuria (come ad esempio nella sepsi) (52).

Biomarcatori di funzione renale

Plasma cystatin C (pCys-C)

pCys-C è da sempre considerata un buon marcatore di funzione renale. Le sue dimensioni, maggiori di quelle della sCr, hanno fatto ipotizzare una sua più precoce ritenzione e, di conseguenza, un suo più precoce aumento in caso di danno renale. Tale ipotesi, però, non è supportata dai risultati degli studi clinici che non hanno documentato una superiorità della pCys-C sulla sCr nella diagnosi precoce di AKI (53,54). Tuttavia, la pCys-C potrebbe avere un ruolo nel monitoraggio della funzione renale nei pazienti ricoverati in ICU, laddove la sensibilità della sCr è fortemente ridotta dalla frequente presenza di iperidratazione e perdita di massa muscolare (55,56). Infine, livelli elevati di pCys-C in pazienti che ricevevano RRT sono risultati predittori indipendenti di necessità di RRT cronica (57).

Biomarcatori di arresto del ciclo cellulare

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (TIMP-2) e Insulin-like Growth Factor-binding Protein 7 (IGFBP7)

Le fasi del ciclo cellulare sono controllate da cicline, chinasi ciclina-dipendenti e inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti attraverso complessi meccanismi solo in parte chiariti. Alterazioni nel passaggio da una fase cellulare all'altra modificano il processo proliferativo producendo riparazioni maladattative (come ad esempio proliferazione fibroblastica e aumentata produzione di collagene che esitano in glomerulosclerosi e fibrosi interstiziale) (58). Al contrario, l'arresto temporaneo del ciclo cellulare in G1

previene la divisione di cellule con DNA danneggiato fino alla sua riparazione, inibendo la proliferazione cellulare durante l'esposizione a stress e lesioni; tale meccanismo protettivo favorisce una riparazione adeguata prevenendo la comparsa di esiti (59).

Le metalloproteasi sono peptidasi che degradano la matrice extracellulare. TIMP-2 è una proteina di 21 kDa che sopprime la proliferazione delle cellule endoteliali in risposta a fattori angiogenici e inibisce l'attività delle proteasi nei tessuti sottoposti a rimodellamento della matrice extracellulare (60). IGFBP7 è una proteina di 29 kDa con numerose funzioni biologiche, tra cui la regolazione della disponibilità dei fattori di crescita insulino-simili e il loro legame ai recettori (61). Sia TIMP-2 che IGFBP7 sono coinvolti nella fase di arresto del ciclo cellulare in G1 che si verifica durante le primissime fasi di stress cellulare (62).

Nel rene, TIMP-2 e IGFBP7 sono espressi dalle cellule tubulari in risposta al danneggiamento del DNA e ad altre forme di lesione. Il meccanismo d'azione proposto suggerisce che TIMP-2 e IGFBP7 blocchino l'effetto dei complessi proteina-chinasi ciclina-dipendenti sulla promozione del ciclo cellulare, che si traduce in un arresto temporaneo del ciclo cellulare in G1 per evitare che le cellule danneggiate si dividano (60). In realtà, i precisi meccanismi d'azione di TIMP-2 e IGFBP7, così come il loro ruolo biologico nella protezione dal danno renale sono ad oggi ancora poco compresi (63). Più corroborata è invece la loro funzione nella rilevazione dell'arresto del ciclo cellulare e quindi come biomarcatori di imminente danno tubulare nell'AKI (64).

Il primo grande studio clinico che ha indagato il ruolo del parametro (TIMP-2 x IGFBP7) nella diagnosi precoce di AKI, lo studio SAPPHERE, ha dimostrato la superiorità dei biomarcatori di arresto del ciclo cellulare sui biomarcatori fino ad allora utilizzati, inclusi NGAL e KIM-1 (65). Lo stesso studio ha individuato due valori soglia di questo parametro ($>0,3 \text{ ng/mL}^2/1000$ e $>2 \text{ ng/mL}^2/1000$), poi convalidati nell'OPAL STUDY, con elevata sensibilità e specificità, rispettivamente, nel predire l'insorgenza di AKI nelle successive 12 ore (65,66). I biomarcatori di arresto del ciclo cellulare sono stati oggetto di numerosi studi successivi volti ad indagare il loro ruolo predittivo di AKI (67), ma anche di mortalità (68), necessità di RRT (68) e ripresa funzionale renale (69).

Nel 2014, la Food and Drug Administration ha approvato l'uso del NephroCheck® (Astute Medical, San Diego, CA, USA), un dispositivo Point-of-Care che misura quantitativamente (TIMP-2x IGFBP7) nelle urine, per individuare i pazienti critici ad alto rischio di AKI. Mentre l'impiego, supportato dai risultati degli studi clinici, del NephroCheck® è sempre più diffuso nelle ICU e come biomcatore di rischio di AKI peri-operatoria, i dati sulle altre popolazioni di pazienti non sono ancora conclusivi e numerosi studi condotti in diversi ambiti clinici sono ad ora in corso (64).

PROSPETTIVE FUTURE

Il biomarcatore ideale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- essere prodotto dalle cellule danneggiate ed esprimere specificità d'organo;
- avere una concentrazione che varia in risposta all'estensione del danno;
- essere determinabile precocemente dopo l'insulto e, in particolare, in una fase in cui il danno sia ancora reversibile;
- decrescere rapidamente in concentrazione quando vi sia una ripresa funzionale;
- poter essere misurato in maniera semplice, rapida e con costi limitati.

Un rapido rilevamento del biomarcatore dopo un insulto renale, e quindi una diagnosi precoce di danno renale o, addirittura, di rischio di danno renale (quest'ultima consentita dai biomarcatori di stress cellulare) è un obiettivo fondamentale. Infatti, ancora oggi, le strategie terapeutiche per l'AKI sono limitate e riguardano perlopiù la sospensione di tutti gli agenti nefrotossici e l'ottimizzazione della gestione del paziente a rischio di AKI, interventi utili se attuati nella fase precoce (e reversibile) del danno renale. A tale scopo, lo sviluppo di biomarcatori utilizzabili nella stratificazione del rischio di AKI prima di un eventuale insulto, sarebbe auspicabile, ma ancora irrealizzato.

Ad oggi, l'elenco dei nuovi biomarcatori renali è in costante aumento. Alcune molecole attualmente allo studio sono il Dickkopf-3 (DKK3), un marcatore di stress tubulare renale che sta dando risultati promettenti nell'identificazione dei pazienti a rischio di AKI dopo interventi di cardiocirurgia (70); la proencefalina-A plasmatica che ha dimostrato un buon valore predittivo di ripresa funzionale renale in pazienti settici con AKI (71,72). La clusterina, la calbindina, la copeptina sono molecole allo studio per la diagnosi precoce di AKI in diversi contesti clinici [come ad esempio AKI post-operatoria (73,74), AKI indotta da farmaci (75)]. Alcune citochine, quali l'interleuchina plasmatica 8 (IL-8) e il recettore del fattore di necrosi tumorale di tipo 1 (TNFR-1, tumor necrosis factor-1 receptor), i cui livelli sono stati associati ad una diversa rapidità del recupero funzionale dopo AKI (76).

Tuttavia, data la complessità della sindrome AKI, le diverse varianti eziologiche e l'eterogeneità dei meccanismi fisiopatologici alla base di ogni sua fase, è difficile ipotizzare che un unico biomarcatore possa riassumere tutte le informazioni utili ed essere impiegabile in tutti i contesti clinici e le fasi dell'AKI. Per questo, ormai da alcuni anni siamo abituati a pensare, più che ad un unico biomarcatore, ad un pannello di biomarcatori che utilizzati insieme potrebbero dare informazioni complementari, utili a migliorare la gestione clinica dell'AKI (21). I risultati finora ottenuti indicano che l'approccio basato sull'integrazione dei dati clinici con i livelli dei biomarcatori offre benefici significativi nella gestione del paziente a rischio o con AKI (77). Le analisi di costo-efficacia condotte fino a questo momento

suggeriscono che l'utilizzo dei nuovi biomarcatori in popolazioni selezionate di pazienti possa determinare una riduzione dei costi complessivi dell'AKI, legata principalmente alla riduzione della necessità di RRT, della durata del ricovero ospedaliero e in ICU e dei tassi di riammissione a 30 giorni (78,79). Tali risultati non sono tuttavia conclusivi e necessitano di essere confermati da ulteriori studi.

CONCLUSIONI

La scoperta e la convalida di nuovi biomarcatori in grado di identificare uno stress cellulare, un danno senza disfunzione renale e una disfunzione renale precoce, prima dell'aumento della sCr, ha ridefinito i criteri diagnostici e di stadiazione dell'AKI. Inoltre, ha consentito la costruzione di un modello concettuale di AKI che include l'intero spettro di eventi e situazioni che vanno dal rene normale, o già interessato da CKD, sino alla risoluzione del quadro clinico o alla morte irreversibile dell'organo. Per ogni stadio di questo modello, i biomarcatori possono contribuire a chiarire i possibili meccanismi di danno e a predire l'evoluzione clinica del danno renale.

Oggi, con l'aumento del numero dei biomarcatori disponibili, sono parallelamente in aumento gli studi in corso. Questi hanno finora dimostrato la superiorità dei modelli di integrazione dei dati clinici con i livelli dei biomarcatori nella gestione del paziente a rischio o con AKI. Ulteriori studi sui nuovi biomarcatori, da soli o più probabilmente riuniti in un pannello, potranno arricchire ulteriormente le nostre conoscenze sull'AKI e fornire strumenti utili per la sua diagnosi precoce, ma anche per la stratificazione del rischio di AKI e per la valutazione della ripresa funzionale renale.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015;41:1411-23.
2. Xu J, Zhu J, Jiang J, et al. Risk factors for long-term mortality and progressive chronic kidney disease associated with acute kidney injury after cardiac surgery. *Med (United States)* 2015;94:1-6.
3. Zager RA. Progression from Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease: Clinical and Experimental Insights and Queries. *Nephron - Clin Pract* 2014;127:46-50.
4. Kellum JA, Lameire N, Aspelin P, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2012;2:1-141. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4089764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4089619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender>. Ultimo accesso: gennaio 2021.

5. Murray TP, Mehta RL, Shaw A, et al. Current use of biomarkers in Acute Kidney Injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Kidney Int* 2014;85:513-21.
6. Haase M, Devarajan P, Haase-fielitz A, et al. The outcome of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)-positive Subclinical Acute Kidney Injury: A Multicenter Pooled Analysis of Prospective Studies. *J Am Coll Cardiol* 2016;57:1752-61.
7. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
8. Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med* 2009;35:1692-702.
9. Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, et al. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study. *Crit Care Med* 2009;37:2252-8.
10. Ostermann M, Chang RWS. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med* 2007;35:1837-43.
11. Mehta RL, Kellum JA, Shah S V, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:1-8.
12. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A New equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
13. Larsson L. Acute quadriplegic myopathy: an acquired "myosinopathy". *Adv Exp Med Biol* 2008;642:92-8.
14. Puthucherry ZA, Rawal J, Mcphail M, et al. Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA* 2013;310:1591-600.
15. Moore E, Tobin A, Reid D, et al. The impact of fluid balance on the detection, classification and outcome of Acute Kidney Injury after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2015;29:1229-35.
16. Basu RK, Andrews A, Krawczeski C, et al. Acute kidney injury based on corrected serum creatinine is associated with increased morbidity in children following the arterial switch operation. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14:218-24.
17. Liu KD, Thompson BT, Ancukiewicz M, et al. Acute Kidney Injury in patients with acute lung injury: impact of fluid accumulation on classification of acute kidney injury and associated outcomes. *Crit Care Med* 2011;39:2665-71.
18. Gaspari F, Ruggerenti P, Porrini E, et al. The GFR and GFR decline cannot be accurately estimated in type 2 diabetics. *Kidney Int* 2013;84:164-73.
19. Cartet-Farnier E, Goutelle-Audibert L, Maire P, et al. Implications of using the MDRD or CKD-EPI equation instead of the Cockcroft-Gault equation for estimating renal function and drug dosage adjustment in elderly patients. *Fundam Clin Pharmacol* 2017;31:110-9.
20. Okusaa MD, Jaber B, Doranc P, et al. Physiological biomarkers of Acute Kidney Injury: A conceptual approach to improving outcomes. *Contrib Nephrol* 2013;182:1-17.
21. Ostermann M, Zarbock A, Goldstein S, et al. Recommendations on Acute Kidney Injury biomarkers from the acute disease quality initiative consensus conference. A Consensus Statement. *JAMA* 2020;3:1-17.
22. Fang F, Hu X, Dai X, et al. Subclinical acute kidney injury is associated with adverse outcomes in critically ill neonates and children. *Crit Care* 2018;22:1-12.
23. Kjeldsens L, Johnsen H, Sengelbv H. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with Human Neutrophil Gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-32.
24. Xu SU, Carlson M, Engström A, et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:365-76.
25. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The Neutrophil Lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10:1033-43.
26. Cowland JB, N B. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase- associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17-23.
27. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:298-307.
28. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore- iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:610-21.
29. Singer E, Markó L, Paragas N, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *acta physiol.* 2013;207:663-72.
30. Mårtensson J, Martling CR, Bell M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: Clinical applicability. *Br J Anaesth* 2012;109:843-50. doi 10.1093/bja/aes357.
31. Agarwal A, Dong Z, Harris R, et al. Cellular and molecular mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol* 2016;127:1288-99.
32. Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med* 2010;36:452-61.
33. Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJL, et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:975-81.
34. McIlroy DR, Wagener G, Lee HT. Kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:211-9.
35. Cai L, Borowiec J, Xu S, et al. Assays of urine levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances. *Clin Chim Acta* 2009;403:121-5.
36. Zhang A, Cai Y, Wang P, et al. Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2016;20:1-13.
37. De Geus HRH, Ronco C, Haase M, et al. The cardiac surgery – associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016;151:1476-81.
38. Tucker SM, Pierce RJ, Price RG. Characterisation of human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. *Clin Chim Acta* 1980;102:29-40.
39. Price RG. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 1992;38(S1):14-9.
40. Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-Acetyl-beta-(D)-Glucosaminidase activity and Kidney Injury Molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:904-12.
41. Fan H, Zhao Y, Sun M, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin, kidney injury molecule-1, N-acetyl- β -D-glucosaminidase levels and mortality risk in septic patients with acute kidney injury. *Arch Med Sci*

- 2018;14:1382-6.
42. Milani P, Graziani MS, Merlini G. Marcatori biochimici di danno renale acuto. *Biochim Clin.* 2010;34:585-90.
 43. Vaidya VS, Ozer JS, Frank D, et al. Kidney Injury Molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in multi-site preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 2010;28:478-85.
 44. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci* 2008;1:200-8.
 45. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:1074-89.
 46. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-Type Fatty Acid – Binding Protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894-902.
 47. Liu X, Guan Y, Jiang C, et al. Early predictors of acute kidney injury: a narrative review. *Kidney Blood Press Res* 2016;41:680-700.
 48. Oh D. A long journey for acute kidney injury biomarkers. *Ren Fail* 2020;42:154-65.
 49. Mutlu H, Gündüz E, Titiz TA, et al. Investigation of AKI with early biomarkers after cardiac surgery. *Braz J Cardiovasc Surg* 2020;35:722-31.
 50. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hu J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50:552-8.
 51. Thielemans N, Lauwerys R, Bernard A. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron* 1994;66:453-8.
 52. Richmond JM, Sibbald WJ, Linton AM, et al. Patterns of urinary protein excretion in patients with sepsis. *Nephron* 1982;31:219-23.
 53. Korevaar JC, Kuiper MA, Spronk PE, et al. Serum and urine Cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. *Intensive Care Med* 2011;37:493-501.
 54. Perianayagam MC, Seabra VF, Tighiouart H, et al. Serum Cystatin C for prediction of dialysis requirement or death in acute kidney injury: a comparative study. *Am J Kidney Dis* 2009;54:1025-33.
 55. Mårtensson J, Martling C, Oldner A, et al. Impact of sepsis on levels of plasma cystatin C in AKI and non-AKI patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:576-81.
 56. Rosa S De, Samoni S, Ronco C. Creatinine-based definitions: from baseline creatinine to serum creatinine adjustment in intensive care. *Crit Care* 2016;20:1-5.
 57. Yang T, Sun S, Lin L, et al. Predictive factors upon discontinuation of renal replacement therapy for long-term chronic dialysis and death in acute kidney injury patients. *Artif Organs* 2017;41:1127-34.
 58. Shankland SJ, Al'Douhaji M. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease. *Exp Nephrol* 1999;7:207-11.
 59. Lameire N, Vanmassenhove J, Van Biesen W, et al. The cell cycle biomarkers: promising research, but do not oversell them. *Clin Kidney J* 2016;9:353-8.
 60. Edelstein CL. Chapter Six - Biomarkers in Acute Kidney Injury. In: Edelstein CL, ed. *Biomarkers of Kidney Disease (Second Edition)*. Academic Press, 2017;241-315.
 61. Evdokimova V, Tognon CE, Benatar T, et al. IGFBP7 Binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by Insulin-Like Growth Factors. *Cell Biol* 2012;5:1-12.
 62. Ortega LM, Heung M. The use of cell cycle arrest biomarkers in the early detection of acute kidney injury. Is this the new renal troponin? *Nefrologia* 2018;38:361-7.
 63. Vijayan A, Faubel S, Askenazi DJ, et al. Clinical use of the urine biomarker [TIMP-2] × [IGFBP7] for Acute Kidney Injury Risk assessment. *Am J Kidney Dis* 2016;68:19-28.
 64. Fan W, Ankawi G, Zhang J, et al. Current understanding and future directions in the application of TIMP-2 and IGFBP7 in AKI clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 2019;57:567-76.
 65. Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, et al. Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care* 2013;17(R25):1-12.
 66. Hoste EAJ, McCullough PA, Kashani K, et al. Original articles derivation and validation of cutoffs for clinical use of cell cycle arrest biomarkers. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:2054-61.
 67. Gocze I, Koch M, Renner P, et al. Urinary biomarkers TIMP-2 and IGFBP7 early predict acute kidney injury after major surgery. *PLoS One.* 2015;10:1-11.
 68. Koyner JL, Shaw AD, Chawla LS, et al. Tissue Inhibitor Metalloproteinase-2 (TIMP-2) IGF-Binding Protein-7 (IGFBP7) levels are associated with adverse long-term outcomes in patients with AKI. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1747-54.
 69. Meersch M, Schmidt C, Aken H, et al. Urinary TIMP-2 and IGFBP7 as early biomarkers of acute kidney injury and renal recovery following cardiac surgery. *PLoS One.* 2014;9:1-9.
 70. Schunk SJ, Zarbock A, Meersch M, et al. Association between urinary dickkopf- 3, acute kidney injury, and subsequent loss of kidney function in patients undergoing cardiac surgery: an observational cohort study. *Lancet* 2019;394(10197):488-96.
 71. Caironi P, Latini R, Struck J, et al. Circulating Proenkephalin, acute kidney injury, and its improvement in patients with severe sepsis or shock. *Clin Chem* 2018;64:1361-9.
 72. Penkid PA, Hollinger A, Wittebole X, et al. Proenkephalin A 119-159 (Penkid) is an early biomarker of septic acute kidney injury: The Kidney in Sepsis and Septic Shock (Kid-SSS) Study. *Kidney Int Reports* 2018;3:1424-33.
 73. Lane BR, Babitz SK, Vlasakova K, et al. Evaluation of urinary renal biomarkers for early prediction of acute kidney injury following partial nephrectomy: a feasibility study. *Eur Urol Focus* 2020;6:1240-7.
 74. Yamashita K, Abe T, Hayata Y, et al. Copeptin concentration following cardiac surgery as a prognostic marker of postoperative acute kidney injury: a prospective cohort study. *J Thorac Dis* 2020;12:6609-17.
 75. Da Y, Akalya K, Murali T, et al. Serial quantification of urinary protein biomarkers to predict drug-induced acute kidney injury. *Curr Drug Metab* 2019;20:656-64.
 76. Murugan R, Wen X, Keener C, et al. Associations between intensity of RRT, Inflammatory mediators, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:926-33.
 77. Guzzi LM, Bergler T, Binnall B, et al. Clinical use of [TIMP-2] × [IGFBP7] biomarker testing to assess risk of acute kidney injury in critical care: guidance from an expert panel. *Crit Care* 2019;23:1-9.
 78. Berdugo MA, Kirson NY, Zimmer L, et al. Economic and clinical benefits of early identification of acute kidney injury using a urinary biomarker. *J Med Econ* 2019;22:1281-9.
 79. Petrovic S, Bogavac-Stanojevic N, Lakic D, et al. Cost-effectiveness analysis of acute kidney injury biomarkers in pediatric cardiac surgery. *Biochem Medica* 2015;25:262-71.