

**Untersuchung des humanen Epididymis Protein 4 (HE4) als
Marker der akuten Epididymitis sowie als Parameter zur
Identifikation von Risikopatienten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Martin Bürger
aus Paderborn

Giessen 2014

Aus der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie
Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH
-Standort Giessen-

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Wagenlehner
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 15.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epididymitis	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie.....	2
1.1.4 Klinik und Diagnostik	4
1.1.5 Therapie.....	6
2. Humanes Epididymis-Protein 4 (HE4).....	9
3. Zielsetzung der Arbeit	12
4. Methoden und Materialien	13
4.1. Ethische Aspekte	13
4.2 Patienteninformation und Einwilligungserklärung	13
4.3 Studienpopulationen	13
4.3.4 Palliativ-Patienten	15
4.3.5 Ein- und Ausschlusskriterien.....	16
4.4 Blutentnahme zur HE4-Bestimmung	16
4.5 Quantifizierung des HE4-Proteins.....	16
4.5.1 Technik des Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest	16
4.5.2 Das HE4-EIA Kit	17
4.5.3 HE4 EIA Protokoll	18
4.6 Klinische Datenerhebung	22
4.7 Dokumentation und statistische Auswertung	23
5. Ergebnisse	25
5.1 Patientenkollektiv Epididymitis mit den klinischen Parametern CRP, Leukozyten und PSA im Verlauf und mit Berücksichtigung der antibiotischen Therapie	25
5.1.1 Patientenkollektiv Epididymitis und antibiotische Vorbehandlung.....	25
5.1.2 Leukozyten im Blut im Zeitverlauf.....	28
5.1.3 C-reaktives Protein im Zeitverlauf.....	29
5.1.4 Prostata spezifisches Antigen (PSA) im Zeitverlauf.....	30
5.2 Kontrollgruppen Testalgie und Urolithiasis	31

5.3 HE4 und akute Epididymitis	33
5.3.1 HE4 im Vergleich mit den Kontrollgruppen Urolithiasis und Testalgie.....	33
5.3.2 HE4 im Vergleich mit klinischen Entzündungsparametern und im Verlauf..	35
5.3.3 HE4 und assoziierte Komorbiditäten	36
5.3.3.1 HE 4 und Nierenfunktion	37
5.3.4 HE4 in Bezug auf Mortalität und Überlebenswahrscheinlichkeit.....	41
5.4 Palliativ-Kollektiv.....	44
5.5 HE4 im Palliativ-Kollektiv	46
5.5.1 HE4 in Assoziation zur Nierenfunktion im Palliativkollektiv	48
5.5.2 HE4 und Effekte auf mögliche Metastasierung	49
5.5.3 Korrelationen der HE4-Werte mit Komorbiditäten im Palliativ-Kollektiv....	50
5.5.4 Die HE4-Werte des Palliativkollektivs in Bezug auf Mortalität und Überlebenswahrscheinlichkeit sowie Identifikator von Risikopatienten.	50
6. Diskussion	52
6.1 Das HE4 Protein als Entzündungsmarker der akuten Epididymitis	52
6.2 HE4 bezogene Korrelationen in beiden Patientenkollektiven.....	53
6.3 Das HE4 Protein als Parameter zur Identifikation von Risikopatienten.....	55
6.3.1 HE4 als Prädiktor der Mortalität in der Epididymitis-Gruppe	55
6.3.2 HE4 als Prädiktor der Mortalität und prognostischer Biomarker in der Palliativgruppe.....	56
6.3.2.1 Berücksichtigung der Nierenfunktion bei Festlegung des HE4 Cut-Offs	59
6.4 Einordnung des HE4 Proteins in die klinische Praxis und jüngste Erkenntnisse	60
7. Zusammenfassungen	62
7.1 Zusammenfassung	62
7.2 Summary	64
8. Abkürzungsverzeichnis.....	67
9. Abbildungsverzeichnis	70
10. Tabellenverzeichnis	72
11. Literaturverzeichnis.....	73
12. Publikationsverzeichnis	85

12.1 Originalarbeit	85
12.2 Vorträge und Posterpräsentationen	85
13. Ehrenwörtliche Erklärung	86
14. Danksagung.....	87
15. Tabellarischer Lebenslauf	88

1. Einleitung

1.1 Epididymitis

1.1.1 Definition

Die akute Epididymitis ist eine Entzündung des Nebenhodens unterschiedlicher Genese. Die sich meist einseitig manifestierenden Leitsymptome Schmerz und Schwellung in möglicher Kombination mit einer Harnwegsinfektion und Fieber, entwickeln sich innerhalb einiger weniger Tage [1]. Davon abzugrenzen ist die chronische Epididymitis, die sich mit persistierenden oder intermittierenden Schmerzen, aber meist ohne Schwellung, über einem Zeitraum von mindestens > 3 Monaten zeigt [2, 3]. Die akute Epididymitis gehört neben der Hodentorsion zu den häufigsten Krankheiten, die sich mit akuten skrotalen Schmerzen manifestieren [4].

1.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz und Prävalenz der akuten Epididymitis in der allgemeinen Bevölkerung wird unterschiedlich beziffert. Auch wenn es viele Untersuchungen und Studien zur Epidemiologie der Epididymitis gibt, so lassen sie sich aufgrund der verschiedenen Patientenkollektive und Datenquellen nur schlecht bzw. nicht untereinander vergleichen.

Nach dem National Center for Health Statistics wurden im Jahre 2002 in den USA bei ambulant behandelten Patienten eine Epididymitis oder Orchitis bei einem aus 144 (0,69%) Männern im Alter zwischen 18 und 56 Jahren diagnostiziert [5]. Es gibt schätzungsweise 600,000 Epididymitis-Fälle pro Jahr in den USA, die sich bei Männern im Alter zwischen 18 und 35 Jahren ereignen [5, 6]. Bohm et al. untersuchten mithilfe der „Medstat’s MarketScan Database“ Versicherungsanfragen bezüglich der Diagnose Epididymitis der privatversicherten Patienten aus den USA. Hier ergaben sich über einen Analysezeitraum von 2001 bis 2004 mit jährlich 5 Mio. Versicherten 316,418 Patienten mit mindestens einer Versicherungsforderung, was einer jährlichen Diagnose einer Epididymitis bei 1,600 aus 100,000 Bewerbern bzw. 1,6% entspricht. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass das untersuchte Patientenkollektiv sehr eingegrenzt war. Um ein kontinuierliches 4-jähriges Follow-up der Patienten (auch bezüglich der Wiedervor-

stellung mit demselben Krankheitsbild) zu gewährleisten, selektierten Bohm et al. nur 14 bis 35jährige Männer, die über den gesamten Zeitraum der vier Jahre durchgehend versichert waren [7].

In einer anderen retrospektiven Studie von Mittemeyer et al. zeigte sich die höchste Inzidenz bei den 610 untersuchten männlichen Soldaten der U.S. Army in einem Alter zwischen 20 und 29 Jahren. Diese Altersgruppe machte 49% aller Fälle aus. Auch wenn alle Altersgruppen von 4 Monaten bis 70 Jahren betroffen waren, befanden sich 70% aller Fälle in der Altersgruppe von 20 bis 39 Jahren. Unterschiede zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen wurden nicht beobachtet [8]. In einer von Doble durchgeführten prospektiven Studie ergab sich ein Durchschnittsalter der 24 Patienten von 28 Jahren [9]. Die akute Epididymitis war im US - Militärdienst für mehr Fehltage als jede andere Krankheit verantwortlich und verursachte 20% der urologischen Aufnahmen in der Militärpopulation [10, 11]. Eine hohe Inzidenz einer Epididymoorchitis zeigt sich in Populationen von querschnittsgelähmten bzw. quadriparalytischen Patienten mit einer Häufigkeit von 20 bis 38,5%. In der retrospektiven Studie von Mirsadraee et al., hatten 65 (38,5%) der 169 untersuchten posttraumatischen rückenmarksverletzten Patienten eine Epididymoorchitis. Die Patienten erlitten nach einer durchschnittlichen Zeit von 3,9 Jahren nach dem traumatischen Ereignis die akute Entzündung. Interessanterweise entwickelte keiner der vasktomierten Patienten eine Epididymoorchitis [12, 13]. Ein doppelter Gipfel fand sich in der Inzidenz bezüglich des Patientenalters in der Studie von Kaver und Koautoren. In den 121 retrospektiv evaluierten Fällen fiel eine bimodale Verteilung mit Höchstwerten in den Altersgruppen 16 bis 30 Jahren und 51 bis 70 Jahren auf. Interessanterweise war die klinische Ausprägung der Symptome bei der Gruppe der unter 30 jährigen Patienten weniger stark als bei den Patienten in der Gruppe über 50 Jahren [14].

1.1.3 Ätiologie

Bakterielle Infektionen sind die häufigste Ursache der Epididymitiden. Die Risikofaktoren, pathogenen Erreger und das folgende Therapiemanagement unterscheiden sich zwischen den Populationen erwachsener Männer und Kinder [6].

Die Epididymitis ist der häufigste Grund für intraskrotale Entzündungen [15]. Obwohl

die Pathophysiologie noch immer nicht völlig verstanden ist, so ist der retrograde Aufstieg von bakteriellen Erregern als Ursache die gemeinhin akzeptierte These [6, 16]. Man nahm zunächst an, dass die Epididymitis durch Reflux von sterilem Urin ausgelöst werden kann. Wolin kam 1971 zu dem Schluss, dass die akute Epididymitis nicht durch kultivierbare Bakterien oder Viren hervorgerufen wird, sondern durch eine mögliche chemische Ätiologie. Eine Epididymitis tritt demnach, induziert durch Reflux in das Vas deferens, hauptsächlich bei Personen auf, die einer ungewohnt hohen körperlichen Anstrengung ausgesetzt sind [11]. Er machte diese Beobachtung bei Rekruten des Militärs, die sich in der körperlichen Strapaze der Grundausbildung befanden und unter denen immer wieder hohe Erkrankungszahlen mit Epididymitis auffielen. Trotzdem schloss Wolin als möglichen Zusatzfaktor eine Gonorrhö nicht aus und eine moderne Chlamydiendiagnostik war noch nicht verfügbar [11].

1979 konnten Berger et al. jedoch zeigen, dass Bakterien für die meisten Fälle verantwortlich waren und die Art des Erregers vom Patientenalter abhängig war [6]. Bei Männern im Alter zwischen 14 und 35 Jahren ist die Epididymitis meist die Folge durch sexuell übertragende Infektionen mit *Neisseria gonorrhoeae* und/oder *Chlamydia trachomatis* [17, 18]. Im Gegensatz dazu ist bei den Patienten über 35 Jahren die Epididymitis meist durch die gewöhnlichen Harnwegsinfektionskeime verursacht, wie z.B. *E. coli* [19-22]. Bei dieser Altersgruppe spielen auch urologisch prädisponierende Faktoren eine Rolle [13]. Dies ist ähnlich bei Kindern, wo in bis zu 50% der Fälle zugrunde liegende urogenitale Veränderungen, wie z.B. hintere urethrale Klappen, Urethralstrikturen, kongenitale urovesikale Fisteln gefunden werden [23-29]. Wenn in diesem Alter eine Epididymitis mit bakteriellem Keimnachweis auftritt, muss eine gründliche urologische Untersuchung erfolgen, um mögliche noch korrigierbare Abnormalitäten aufzudecken [30]. Allerdings ist die akute bakterielle Epididymitis bei Kindern selten, findet sich doch nur bei ca. 1% der Kinder mit akutem Skrotum überhaupt eine Harnwegsinfektion [31].

Bei den Männern über 35 Jahren spielen oftmals Blasenauflusstörungen eine wichtige ätiologische Rolle [32, 33]. Gerade bei Patienten über 50 Jahren werden begleitende urologische Erkrankungen die prädisponierend für eine Epididymitis sein können so häufig, dass eine Abklärung erfolgen muss [34]. So fanden Höppner et al. in einer Studie bei 336 Männern > 60 Jahren mit akuter Epididymitis bei 187 (56%) Obstruktionen des unteren Harnabflustraktes [35]. Hier sind als Verursacher hauptsächlich Bakterien aus der Gruppe der Enterobakterien auszumachen [36, 37].

Unterschiede hinsichtlich der Ätiologie zeigten sich auch bei der sexuellen Orientierung. So konnten Berger et al. zeigen, dass sich die Epidemiologie und Ätiologie der Epididymitis bei homosexuellen Männern von der bei heterosexuellen Männer unterscheidet. Hier führte ungeschützter analer Geschlechtsverkehr zu einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit. Grund dafür waren mehrheitlich coliforme Bakterien [38]. Viele Fälle von Epididymitiden werden durch *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* ausgelöst. Man geht in den USA davon aus, dass es parallel zu den gemeldeten Anstiegen der sexuell übertragbaren Gonokokken- und Chlamydieninfektionen auch zu einer Zunahme bei den Epididymitiden kommen wird [39]. Obwohl es keine Daten bezüglich der Inzidenz oder Prävalenz der Epididymitis bei an HIV/AIDS erkrankten Männern gibt, weisen Patientenkollektive mit einer erhöhten Rate an Epididymitiden auch vermehrt Patienten mit HIV auf [40].

Als weitere infektiöse Erreger sind die Tuberkulose [41-43] und Viren bekannt. Systematische Untersuchungen zur viralen Epididymitis existieren jedoch nicht. Diskutiert werden Mumpsviren, Rhinoviren, Adenoviren, Influenza- und Enteroviren [11, 20]. Derzeit gehört eine Untersuchung auf Viren nicht zur Routinediagnostik, doch scheinen deutlich mehr Patienten von einer Mumps-Epididymitis betroffen zu sein als angenommen [44, 45].

Daneben gibt es auch einige Formen einer nicht infektiösen Genese der Epididymitis. Diese umfassen systemische Erkrankungen wie Morbus Behcet [46, 47], Periarteritis nodosa [48, 49], können aber auch medikamentös induziert (Amiodaron) sein [50, 51]. Diskutiert wird auch eine postinfektiöse Genese nach Infektionen des respiratorischen Traktes vor allem bei Jungen im Alter von unter 14 Jahren [52].

Trotz gründlicher standardisierter Untersuchung der von Epididymitis betroffenen Patienten verbleibt die Ätiologie bei 30 bis 40% der Fälle ungeklärt [36]. Wahrscheinlich könnten hier vermehrt molekularbiologische Methoden zur weiteren Aufklärungen beitragen [53].

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Bei der Evaluation von Patienten die sich mit akutem Skrotum vorstellen ist es von großer Bedeutung, gründlich die Differentialdiagnosen zu evaluieren. Die Epididymitis kann einer der Gründe für das akute Skrotum sein. Um hierbei die geeignete Therapie einzuleiten, ist es von besonderer Bedeutung, schnellstmöglich weitere Differentialdiagnosen auszuschließen, zumal sie, z. B. bei einer Hodentorsion, eine chirurgische Exploration erfordern [4, 54]. Die Diagnose der akuten Epididymitis stützt sich primär auf die klinische Untersuchung. Hier zeigt sich bei ca. 75% der Patienten ein schmerzender geschwollener Nebenhoden. Unterstützend zur Diagnosefindung sind auch systemische Zeichen wie Fieber. Allerdings schwanken hier die Angaben je nach Patientenkollektiv zwischen 9,5% bei Kindern [58], 37,2% bei einem gemischten Patientenkollektiv (4 Monate bis 70 Jahre alt) von Mittemeyer [8] und bis zu 74% bei einem Patientenkollektiv älter als 16 Jahre bei Kaver [14].

Zur weiteren Unterscheidung und Abgrenzung der Epididymitis zur Hodentorsion und anderen entzündlichen Prozessen bei einem akuten Skrotum, wird u.a. die Duplexsonographie aufgrund der geringen Invasivität und guten Verfügbarkeit häufig eingesetzt [55]. In einer dreijährigen Studie untersuchen Yagil et al. 620 Patienten die mit einem akuten Skrotum in die Notaufnahme kamen. Die Befunde aus den Doppler-Ultraschall Untersuchungen wurden dann mit den endgültigen Diagnosen und, falls eine chirurgische Exploration erfolgte, mit den histologischen Ergebnissen verglichen. Dabei ergab sich für die Diagnose Hodentorsion mit Doppler-Ultraschall eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 96% [56]. Im Gegensatz dazu ergab sich in einer retrospektiven Studie von Mushtaq et al. kein Benefit bezüglich der Differentialdiagnosen aus der Anamnese. In der Studie mit 204 Jungen die mit akutem Skrotum in die Notaufnahme kamen, fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Anamnese, die bei der Abklärung der Differentialdiagnose hätten helfen können [57].

Der rechte und linke Nebenhoden sind gleich häufig betroffen [14, 58]. Eine beidseitige Entzündung findet sich je nach Studienpopulation nur in ca. 2 bis 8% der Fälle [20, 59]. Ein Übergreifen der Entzündung auf den Hoden konnten Kaver et al. bei bis zu 68% der Patienten beobachten [14]. Daher sprechen viele Autoren auch von einer Epididymoorchitis [14].

Die Anamnese sollte Fragen bezüglich systemischen Symptomen (Fieber, Schüttelfrost), Harnwegssymptomen (Dysurie, urethraler Ausfluss, Harnfrequenz) und

eine gründliche Sexualanamnese (ungeschützter Sex, Analverkehr) beinhalten [60]. Bei der körperlichen Untersuchung kann sich im Anfangsstadium der Nebenhodenschwanz geschwollen darstellen; später können der komplette Nebenhoden und zusätzlich der Samenstrang als auch Hoden mitbetroffen und vergrößert sein [60].

Die mikrobielle Diagnostik stützt sich sowohl auf die klassische Urinkultur aus Mittelstrahlurin zum Nachweis einer Harnwegsinfektion als auch bei jungen sexuell aktiven Patienten bzw. Patienten mit entsprechendem Verdacht auf eine sexuell übertragbare Erkrankung auf den Urethralabstrich zum Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* [61, 62]. In Deutschland sind Ampflikationsmethoden, wie die polymerase chain reaction (PCR) aus dem Material des Urethralabstriches zum Nachweis von Gonokokken und Chlamydien weit verbreitet, während kulturelle wie zytologische Techniken eine untergeordnete Rolle spielen [53].

Daneben können auch die Messung von Akut-Phase Proteine zur Differentialdiagnose bzw. Abgrenzung zu nichtentzündlichen Erkrankungen bei akutem Skrotum als auch zur Verlaufskontrolle bei Epididymitis sinnvoll sein. In einer Studie von Doehn et al. zur Evaluierung der Brauchbarkeit von Akut-Phase-Proteine zur Differentialdiagnose erreichte das C-reaktive Protein eine Sensitivität von 96,2% und eine Spezifität von 94,2% [63]. Auch Asgari et al. konnten die Tauglichkeit des C-reaktiven Proteins mit einer Sensitivität von 93,4% und Spezifität von 100% zur Abgrenzung der Epididymitis von anderen Ursachen bei der Differentialdiagnose für das akute Skrotum untermauern. In derselben Studie wurde zusätzlich auch die Aussagekraft zur gleichen Problemstellung der Blutsenkungsgeschwindigkeit untersucht. Sie ergab eine Sensitivität von 95,6% und eine Spezifität von 85,1% [64]. Eine Leukozytose dagegen findet sich nur bei etwa 8 bis 22% der Patienten und kann die Verdachtsdiagnose einer akuten Epididymitis nur erhärten [65, 66] Dennoch wird in keiner Leitlinie aktuell die Verwendung eines Entzündungsmarkers zur Diagnose und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs eingesetzt [67, 68]. Einen nebenhodenspezifischen Biomarker gibt es derzeit nicht.

1.1.5 Therapie

Der korrekte Gebrauch von Antibiotika gegen die zugrunde liegenden Krankheitserreger ist die entscheidende Maßnahme zur erfolgreichen Therapie der

Epididymitis. Es sollte eine empirisch gestützte antimikrobielle Therapie eingeleitet werden.

Ein empirisches Schema wird in den Guidelines von 2010 des „Centers for Disease Control and Prevention“ (CDC) für die Therapie der Epididymitis empfohlen (Tabelle 1) [67].

Die European Association of Urology empfiehlt in ihren Leitlinien von 2013 die initiale Behandlung mit Ofloxacin p.o. bzw. Levofloxacin p.o. für 10 Tage und bei Nachweis von *C. trachomatis* die Fortführung mit Doxycyclin bis zu einer Gesamttherapiedauer von 14 Tagen. Makrolide werden hier als Alternative angesehen (Tabelle 2) [68].

Tabelle 1: CDC Guidelines 2010 zur Behandlung der akuten Epididymitis

Recommended Regimes

Ceftriaxon 250mg IM in a single dose

PLUS

Doxycycline 100mg orally twice a day for 10 days

For acute epididymitis most likely caused by enteric organisms

Levofloxacin 500mg orally once daily for 10 days

OR

Ofloxacin 300 mg orally twice a day for 10 days

Tabelle 2: EAU Guidelines 2013 zur Behandlung der akuten Epididymitis und Orchitis

First choice:

Fluoroquinolones, preferably those with activity against *C. trachomatis*, e.g. Levofloxacin or Ofloxacin

If *C. trachomatis* has been detected as an aetiological agent:

Doxycycline 100mg orally twice a day for 10 days (Macrolides are alternative agents)

Wichtig ist gerade bei Patienten mit Chlamydien-Infektion die Untersuchung und Mitbehandlung des Sexualpartners [6, 22, 69]. So untersuchten Robinson et al. in einer Studie an 49 Männern im Alter unter 35 Jahren auch 28 Partnerinnen und stellten bei 20 (80%) ebenfalls eine Chlamydien-Infektion fest [62].

Darüber hinaus empfiehlt sich als supportive Therapie Bettruhe, Hochlagerung der Hoden und antiphlogistische Therapie. Da eine Epididymitis zu einem permanenten Verschluss des Nebenhodenganges mit der Konsequenz der Infertilität führen kann, sollte man insbesondere bei jungen Männern eine zusätzliche antiphlogistische Therapie mit Methylprednisolon erwägen [68].

Die operative Therapie im Sinne einer Orchiektomie sollte aufgrund der gravierenden Folgen nur als ultima ratio bei Versagen der konservativen Therapie durchgeführt werden, d.h., wenn z.B. eine Hodennekrose vorliegt und die Erkrankung fortschreitet [70]. Die Indikation zur Orchiektomie wird von einigen Autoren zeitlich früher gestellt, wenn ein Hodenverlust als unbedeutend erachtet wird und die Rekonvaleszenz unter operativen Bedingungen schneller ist als unter konservativer Therapie [71]. Die Orchiektomie ist je nach Serie bei bis zu 15% aller Patienten notwendig gewesen [8, 35, 71-73].

2. Humanes Epididymis-Protein 4 (HE4)

Im Jahre 1991 publizierten Kirchhoff et al. erstmals die Identifizierung des humanen Epididymitis Protein 4 (HE4) im Epithel des distalen Nebenhodens [74]. Das HE4 Protein gehört zu der Familie der humanen Epididymis Proteinen HE1 bis HE6, welche hauptsächlich im Nebenhoden exprimiert werden [75]. Die Exprimierung einiger der Proteine ändern sich nach Vasektomie [76]. Die Verteilung der verschiedenen HE Proteine im Nebenhoden ist unterschiedlich, wobei sich die höchsten Konzentrationen des HE4 Proteins im distalen Nebenhoden und im proximalen Vas deferens fanden [74]. Aufgrund der Strukturbeschaffenheit und Ähnlichkeit zu Proteinase Inhibitoren des Proteins, wurde eine mögliche Funktion in der Spermien Reifung vermutet [74, 77]. Das HE4-Protein zeigt Merkmale eines sekretorischen Proteins und gehört in die Gruppe der „whey acidic four-disulfide core proteins“ (WFDC) [78]. Auch bekannt als WFDC2, liegt das HE4 Gen auf dem Chromosom 20q12-13 und kodiert für ein 13kD leichtes Protein, auch wenn das reife glykosylierte Protein HE4 schätzungsweise zwischen 20 und 25kD darstellt [79, 80]. 1991 postulierte Kirchhoff, dass die humanen Epididymis Proteine nur im Nebenhoden exprimiert und damit spezifisch für den Nebenhoden sind. Diese Ergebnisse deckten sich mit Ergebnissen bei ebenfalls untersuchten Rindern [74]. Bei weiteren Untersuchungen fand man heraus, dass das HE4 Protein nicht spezifisch für den Nebenhoden ist, sondern auch in anderen normalen Geweben wie z.B. respiratorischem Epithel, als auch in erkranktem Gewebe, wie z.B. Ovarialkarzinomen exprimiert wird und zusätzlich die Eigenschaft hat, sich in unterschiedliche Isoformen aufzuspalten [79, 81]. Dabei fiel auf, dass HE4 vor allem bei einigen Karzinomen des Ovars, wie z. B. beim endometrioidem und serös-papillärem Zystadenokarzinom stark überexprimiert wird [82-85]. Gerade diese starke Überexprimierung in einigen Ovarialkarzinomen in Relation zur Expression in gesundem Gewebe führte zu der Annahme, dass das HE4 Protein möglicherweise Aufschluss über Mechanismen der Karzinogenese geben oder aber als ein möglicher Tumormarker bzw. zur Abgrenzung zu anderen gynäkologischen Erkrankungen zu gebrauchen sein könnte [86, 87]. Zusätzlich zu der Exprimierung des Proteins im Gewebe, konnte HE4 ebenfalls im Serum bei Patienten mit Ovarialkarzinom in hohen Konzentrationen gemessen werden [88]. So konnten Hellstrom und Mitarbeiter in einer Vergleichsstudie zwischen Ovarialkarzinompatientinnen und einer gesunden Kontrollgruppe mit Hilfe des HE4 die

an Ovarialkarzinom erkrankten Patientinnen mit einer 67%igen Sensitivität und 96%igen Spezifität ausfindig machen [89]. In nachfolgenden Evaluationen schon bekannter Biomarker für Ovarialkarzinome wie dem CA125 zeigte HE4 die höchste Sensitivität als Screeningmarker insbesondere im frühen Krankheitsstadium [88]. Aufgrund der relativ hohen Inzidenz der Ovarialtumore, vergesellschaftet mit einer wegen der unspezifischen Symptome schwer und deshalb meist spät gestellten Diagnose und folgender Behandlung hohen Mortalität (weltweit bei Frauen viert häufigste Todesfolge von Tumorerkrankungen [90]), ist die Malignitätsabklärung das vorrangige Ziel bei der Diagnostik von pelvinen Raumforderungen. Schätzungsweise 5 bis 10% der US amerikanischen Frauen unterziehen sich aufgrund des Verdachts einer ovariellen Neoplasie einer explorativen Operation. Bei 13 bis 21% dieser Frauen stellt sich dann die Diagnose einer ovariellen Malignität [91]. In Kombination von HE4 mit dem klinisch erprobten Biomarker CA125, konnte eine präzisere Vorhersage mit einer Sensitivität von 76% und Spezifität von 95% bezüglich der Malignität bei pelvinen Raumforderungen getroffen werden, als mit dem getrennten Gebrauch beider Biomarker [92, 93]. Gerade im frühen Krankheitsstadium und bei Hochrisikopatienten ergibt sich hier ein Nutzen, das HE4 Protein in Verbindung mit dem CA125 zur Abklärung von unklaren pelvinen Raumforderungen einzusetzen [94-97]. Dies bestätigte auch eine im Dezember 2012 publizierte Meta-Analyse mit der Zielsetzung, die diagnostische Genauigkeit des HE4 Proteins bei der Differenzierung zwischen malignen Tumoren des Ovars und anderen benignen gynäkologischen Erkrankungen zu untersuchen. Dabei wurden alle bis Juni 2012 verfügbaren Studien, die sich mit der Evaluation des HE4 Proteins befassten, aus den Medline, EMBASE und Cochrane Library Datenbanken verglichen. Letztlich trafen auf 11 Studien mit insgesamt 3395 Patienten die Einschlusskriterien zu. Hierbei hatte das HE4 Protein eine zusammengefasste Sensitivität von 0.74 und eine Spezifität von 0.87 in der Unterscheidung zwischen malignen und benignen gynäkologischen Tumoren [98]. Interessanterweise zeigte sich mit gleicher Sensitivität im Vergleich zu den Serumwerten das HE4 Protein derselben Patienten auch in untersuchten Urinproben [93, 99]. Macuks et al. untersuchten die differentialdiagnostische Genauigkeit des HE4 Proteins aus Urinproben und stellten fest, dass bei Patienten mit Ovarialkarzinom im Früh- als auch Spätstadium ($p=0,001$) signifikant höhere Urin-HE4 Werte im Vergleich zu benignen Ovarialtumoren aufwiesen ($p=0,044$) und somit zur Unterscheidung beitragen können [100].

Neuere Studien untersuchten zudem auch die prognostischen Fähigkeiten des HE4 Proteins bei Patientinnen mit Ovarial-Karzinom im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben bzw. als Prädiktor der Überlebenschancen. Hierbei zeigte sich, dass hohe HE4 Werte vor begonnener Therapie ein starker und unabhängiger Prädiktor für eine schlechtere Prognose in Bezug auf die progressionsfreie Überlebenszeit bzw. zur Überlebenschancen im Vergleich zu niedrigen Werten waren [101, 102]. Doch nicht nur auf das Ovarial-Karzinom beschränken sich die Untersuchungen der HE4 Expression. So entdeckte man auch bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom erhöhte HE4 Serumwerte und es fand sich zusätzlich eine signifikante Korrelation der HE4 Werte mit einer erniedrigten Überlebenschancen sowie ein erniedrigter Zeitraum des progressionsfreien Überlebens [103]. Ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert war die erhöhte HE4 Expression bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge. In einer Studie von Yamashita et al. zeigte sich HE4 bei den 137 eingeschlossenen Patienten mit Adenokarzinom der Lunge als ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Überlebensrate und das krankheitsfreie Überleben [104]. Weiterhin fanden Xi et al. ferner bei Patienten mit Urothelkarzinom in einer gemischten Population eine signifikant erhöhte HE4 Serumkonzentration im Vergleich zum gesunden Vergleichskollektiv. Dabei spielte es keine Rolle, wie weit der Tumor bereits fortgeschritten war, so dass auch hier das Potential eines möglichen Screeningmarkers liegen könnte [105]. Interessant dazu und insbesondere im Hinblick auf das Fortschreiten eines Tumors, konnten Moore et al. signifikante Unterschiede der HE4 Serumwerte bei der Invasion des Endometriumkarzinoms (< bzw. > 50% des Uterus bzw. höhere Tumorstadien) und somit eine Korrelation der Eindringtiefe feststellen. So könnte sich laut der Autoren bei Frauen mit dieser Erkrankung ein Nutzen für die präoperative Planung ergeben [106].

3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des humanen Epididymis Protein 4 (HE4) als Marker der akuten Epididymitis in Patienten und verschiedenen Kontrollgruppen unter Berücksichtigung der Komorbiditäten.

- Hierfür sollten zunächst die HE4 Konzentrationen bei Patienten mit akuter Epididymitis in Zusammenhang mit den anderen klinischen Infektionsparametern analysiert und im Therapieverlauf überprüft werden. Als Kontrollpatienten sollten Patienten mit Testalgie und Urolithiasis dienen.
- Auf Grundlage dieser Daten sollte die Assoziation von HE4 mit Multimorbidität und Mortalität an einer Gruppe Palliativpatienten überprüft und näher charakterisiert werden.

4. Methoden und Materialien

4.1. Ethische Aspekte

Für alle Studienpopulationen bei denen HE4 im Serum im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, lag ein entsprechendes positives Ethikvotum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität am Standort Giessen vor. Patienten mit Epididymitis und Testalgie wurden unter dem Aktenzeichen AZ 100/07 (Diagnostik und Therapie der Epididymitis) eingeschlossen. Für Patienten aus der Kontrollgruppe mit Urolithiasis lag das Ethikvotum AZ 166/07 (Biomarker der Urolithiasis) vor. Patienten mit palliativer Erkrankung wurden unter dem Ethikvotum AZ 175/09 (HE4 als prognostischer Marker) in die Untersuchungen eingeschlossen.

4.2 Patienteninformation und Einwilligungserklärung

Alle Patienten mussten vor Teilnahme ihre Einwilligung an der Studie schriftlich erklären. Jeder Patient wurde von den Studienleitern (Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner und Dr. A. Pilatz, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie) oder dessen Stellvertreter über die Hintergründe, Risiken, Nutzen und Ablauf der Studie bei Teilnahme sowie über Versicherung bei studienbedingter Schädigung als auch über die Möglichkeit eines Widerrufs der Einwilligung ohne jeglichen Nachteil aufgeklärt. Des Weiteren wurden den Patienten die Patienteninformation und Einwilligungserklärung ausgehändigt um bei Bedarf ausreichend Zeit zur Überlegung und zur Vorbereitung von Fragen zu ermöglichen. Bei Einwilligung zur Teilnahme an der Studie erklärte sich der Patient damit einverstanden, dass seine persönlichen Daten bezüglich seiner Krankenanamnese prospektiv verfolgt und im Rahmen der Studie genutzt werden konnten.

4.3 Studienpopulationen

4.3.1 Epididymitis-Patienten

Eingeschlossen wurden adulte Patienten mit der eindeutigen klinisch gesicherten Diagnose einer akuten Epididymitis, die sich in der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Uniklinik Giessen und Marburg GmbH am Standort Giessen vorgestellt haben. Es wurden insgesamt 77 Patienten im Zeitraum von 06/2007 bis

12/2009 rekrutiert. Alle Patienten wurden standardisiert von einem Arzt (Dr. A. Pilatz) untersucht. Anamnestisch wurden die Patienten hinsichtlich Vorerkrankungen, Vorbehandlungen mit Antibiotika und Analgetika, Schmerzintensität mittels visueller Analogskala, Dauer der Skrotalbeschwerden und vorangegangenen Harnwegsinfektionen befragt (siehe Aufnahmebogen im Anhang). Eine Fragenbogenanalyse umfasste die erektile Funktion (Internationaler Index der erektilen Funktion: IIEF-15), die Prostatahyperplasie (International Prostate Symptom Score: IPSS) und prostatitische Beschwerden (National Institute of Health – Chronic Prostatitis Symptom Index; NIH-CPSI).

Die Erregerdiagnostik erfolgte über die klassische Urinkultur aus Mittelstrahlurin hinsichtlich typischer uropathogener Keime. Bei sexuell aktiven Patienten erfolgte vor Analyse des Mittelstrahlurins zunächst die Untersuchung auf *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Mycoplasmen genitalium* aus dem Ersturin mittels PCR [53]. Daneben erhielten alle Patienten eine Routinelaboruntersuchung. Dies beinhaltete die Parameter Kreatinin (mg/dl), C-reaktives Protein (mg/l), Leukozyten im Blutbild (giga/l) und PSA im Serum (ng/dl) zur Beurteilung der Mitreaktion der Prostata bei der akuten Entzündung.

Alle Patienten wurden ausschließlich konservativ behandelt und in Abhängigkeit des Allgemeinzustandes entweder ambulant geführt oder stationär aufgenommen [67]. Nach Abschluss der konservativen Therapie wurden - wenn möglich und medizinisch indiziert - die Patienten weiter erneut nach ca. zwei Wochen und nach ca. drei Monaten klinisch beurteilt. Hiernach erfolgte per Telefon die weitere prospektive Betreuung der Patienten.

Sowohl bei Erstvorstellung der Patienten als auch im zeitlichen Verlauf wurde jeweils Serum gewonnen und für spätere Analysen bei -80°C eingefroren. Alle Proben wurden mittels fortlaufender Nummer verblindet.

4.3.2 Testalgie-Patienten

Als eine Kontrollgruppe dienten 16 Patienten mit der Diagnose einer Testalgie, die sich im Zeitraum von 06/2007 bis 07/2010 in der urologischen Poliklinik vorstellen. Bei diesen adulten Patienten bestand lediglich eine skrotale Schmerzsymptomatik unklarer Genese. Ein klinisches oder sonographisches Infiltrat fand sich jedoch nicht. Die Patienten stellten sich in der urologischen Poliklinik als Notfall vor und alle wurden konservativ analgetisch behandelt. Die Untersuchung erfolgte standardisiert von einem Arzt (Dr.

A. Pilatz). Bei jedem Patienten wurde einmalig Serum gewonnen und für spätere Analysen bei -80°C eingefroren. Alle Proben wurden mittels fortlaufender Nummer verblindet. Ferner erfolgte die Erfassung der Komorbiditäten der einzelnen Patienten.

4.3.3 Urolithiasis-Patienten

Als weitere Kontrollgruppe wurde auf die Serumproben von Patienten mit Rekonvaleszenz nach behandelter Urolithiasis zurückgegriffen. Für dieses Kollektiv wurden in dem Zeitraum von 06/2007 bis 07/2010 insgesamt 20 geeignete Patienten eingeschlossen und die Anamnese mitsamt der Komorbiditäten erfasst. Die Serumproben wurden aliquotiert bei -80°C gelagert. Alle Proben wurden mittels fortlaufender Nummer verblindet.

4.3.4 Palliativ-Patienten

Als nach ersten Vorversuchen der Einfluss von Morbidität und Mortalität auf die Höhe der HE4-Werte vermutet wurde, erfolgte nach entsprechendem Ethikvotum die Rekrutierung einer möglichst kranken und multimorbiden Patientengruppe. Die Patienten in der Palliativ-Gruppe wurden an zwei verschiedenen Standorten rekrutiert. In Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik V (Prof. Dr. U. Sibelius) wurde bei der stationären Aufnahme den Patienten die Teilnahme an der Untersuchung angeboten. Insgesamt 95 Patienten willigten schriftlich ein, und zusätzliches Serum-Blut wurde abgenommen. Ebenso wurden 24 multimorbide Patienten der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie eingeschlossen. Das Serum wurde entsprechend mit fortlaufender Nummer verblindet, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Auswertung der HE4-Werte erfolgte unter Berücksichtigung der ebenfalls entnommenen Routine-Laborparameter. Dies umfasste ein Basislabor aus Blutbild, Elektrolyten, Entzündungsparametern und verschiedenen Tumormarkern (LDH, PSA, CA125 etc.).

Durch dieses Verfahren wurden insgesamt 119 adulte Patienten über einen Zeitraum vom 01/2010 bis 07/2010 rekrutiert. Die Erfassung der Komorbiditäten und des Tumorstadiums erfolgte über die von den Stationsärzten verfassten elektronischen Arztbriefe aus dem hausinternen KAOS-System (siehe auch 4.6 Klinische Datenerhebung).

4.3.5 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden ausschließlich volljährige Patienten ohne gesetzliche Betreuung. In der Epididymitis-Kohorte war die Diagnose der Epididymitis klinisch gesichert. Patienten aus der Testalgie-Gruppe durften keinerlei Hinweis auf eine infektiöse Urogenitalerkrankung haben. In der Palliativ-Kohorte wurden ausschließlich Patienten mit einem gesicherten, fortgeschrittenen Tumorleiden eingeschlossen.

Ausschlusskriterien waren eine ausgeprägte Niereninsuffizienz (Richtwert: Serumkreatinin ≥ 2 mg/dl), da nach Herstellerangaben des HE4 EIA Kits die Interpretation der HE4-Werte bei Niereninsuffizienz erschwert wird. Alle Patienten in dem Palliativkollektiv wurden nach vollständigem Vorliegen der Befunde re-evaluiert und Patienten mit kurativem Ansatz aus der Population ausgeschlossen.

4.4 Blutentnahme zur HE4-Bestimmung

Im Speziellen wurde zur Bestimmung des HE4-Proteins den Patienten zum gleichen Zeitpunkt der Routinelaborwerte ein weiteres 7,5 ml Serumröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) abgenommen, mittels fortlaufender Nummer verblindet und bis zur weiteren Verarbeitung (maximal 2h) im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Danach wurden die Proben im Forschungslabor der Urologie (Leiter: Prof. Dr. K. Steger) bei 4000g und 20°C für 10 min zentrifugiert und hiernach in 2 ml Eppendorfröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) aliquotiert und bei -80°C kryokonserviert.

4.5 Quantifizierung des HE4-Proteins

4.5.1 Technik des Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest

Der Double-Antibody-Sandwich-ELISA gehört zu den immunologischen Nachweisverfahren und ist eine Methode der Enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (EIA) bzw. Enzyme Linked Immunoabsorbent Assays (ELISA), erstmals beschrieben und durchgeführt von Solomon Berson und Rosalyn Sussman Yalow bei der Messung von menschlichem Insulin bei Männern im Jahre 1960 [107]. Es ist ein spezifisches und hoch sensitives Verfahren zur quantitativen Messung von Antikörpern, Antigenen oder anderen Analyten in flüssigen Proben. Hierbei werden zwei verschiedene spezifische monoklonale Antikörper benutzt, die an das nachzuweisende Agens an zwei verschiedenen Stel-

len binden. Einer der monoklonalen Antikörper, sogenannter Coating-Antikörper, ist an einer festen Phase gebunden (Mikrotiterplatte) [108]. Die zu untersuchende flüssige Phase wird in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und einen vorgegebenen Zeitraum inkubiert. In dieser Zeit bindet der in den Vertiefungen gebundene Antikörper den nachzuweisenden Analyt und alle restlichen, nicht gebundenen Teile werden danach durch Waschen aus der Mikrotiterplatte entfernt. Dann wird der zweite Antikörper, sogenannter Detection-Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, hinzugegeben und bindet ebenfalls, jedoch an einer anderen Stelle als der Coating-Antikörper, an dem zu messenden Antigen [109]. Überschüssige nicht gebundene Antikörper werden durch erneutes Waschen der Mikrotiterplatten entfernt und danach ein zum Enzym passendes chromogenes Substrat hinzugegeben [110]. Das Substrat wird von dem Enzym zu einem Produkt umgesetzt, das photometrisch nachweisbar ist und mit Hilfe von Kalibrierungskurven auch quantitativ messbar wird [111].

Zur quantitativen Darstellung des im ELISA nachgewiesenen Analyten wird ein Spektrophotometer benutzt. Hierbei wird ein Lichtstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge durch das entstandene Farb-Produkt geleitet und die Absorption gemessen. Dabei ist die Farbintensität des Produktes proportional und die Absorption reziprok zur Konzentration des in der Lösung enthaltenen Analyten [111].

4.5.2 Das HE4-EIA Kit

Der HE4-EIA Kit, vertrieben von Fujirebo Diagnostics, Inc. / Schweden, ist ein nicht kompetitiver Festphasenimmunoassay für die quantitative Bestimmung von HE4 aus menschlichem Serum. Die Testsysteme wurden freundlicherweise von Fujirebo Diagnostics für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Test beruht auf dem direkten Sandwich-Verfahren unter Verwendung von zwei monoklonalen murinen Antikörpern, 2H5 und 3D8. Beide Antikörper binden an zwei Epitope der C-WFDC-Domäne des HE4-Proteins. Die Kalibratoren, Kontrollen und Serumproben von Patienten werden zusammen mit biotinyliertem Anti-HE4 monoklonalem Antikörper (MAb) 2H5 in die mit Streptavidin beschichteten Mikrotiter Wells gegeben und inkubiert. Das vorkommende HE4 Protein in den Kalibratoren oder Proben wird an die Streptavidin beschichteten Vertiefungen mit Hilfe des biotinylierten Antikörpers Anti-HE4 MAb 2H5 während der Inkubation absorbiert. Dann werden die Mikrotiterplatten

gewaschen und mit dem Detektionsantikörper Anti-HE4 MAb 3D8 inkubiert. An diesem Antikörper, in diesem Test-Kit auch HRP (Meerrettichperoxidase) genannt, ist ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt. Nach erneutem Waschen wird chromogenes Substrat hinzugeführt, welches durch das an dem Detektionsantikörper gekoppelte Enzym zu einem Farbprodukt umgesetzt wird. Das entstandene Farbprodukt ist proportional zu der vorhandenen HE4-Menge in den Proben.

Die HE4 EIA Messbereiche liegen zwischen 15 und 900 pmol/l. Sollten höhere Werte in den Proben zu erwarten sein, so wird empfohlen, die Proben vor der Testung zu verdünnen.

Jedes Test Kit enthält Reagenzien für insgesamt 96 Tests. Weitere benötigte Materialien, die nicht in dem Test Kit enthalten sind:

- Rüttelplatte für Mikrotiterplatte
- Spektrophotometer für Mikrotiterplatte
- Präzisionspipetten
- destilliertes Wasser

Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien:

- HE4 – Kalibrator A mit 8 ml und B bis F mit jeweils 1 ml
- HE4 Kontrollen 1 und 2 mit jeweils 1 ml
- Waschlösung 50 ml
- biotinyliertes Anti-HE4 monoklonales Antikörper (MAb) 2H5 – Substrat 15 ml
- 96 Mikrotiter Wells mit Streptavidin beschichtet
- Substrat mit Detektionsantikörper Anti-HE4 MAb 3D8 gekoppelt mit HRP (1 x 0,75 ml)
- chromogenes TMB HRP – Substrat 12 ml
- Stopplösung 15 ml
- Tracerlösung 15 ml

4.5.3 HE4 EIA Protokoll

Alle HE4 EIA Tests wurden unter standardisierten Bedingungen von dem Verfasser der vorliegenden Arbeit mit den verblindeten Proben durchgeführt, um eine möglichst hohe Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

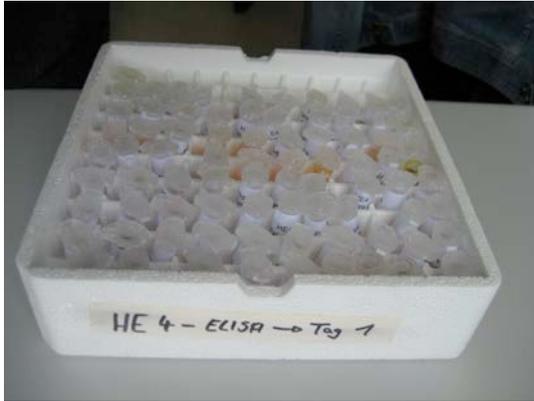


Abbildung 1: 80 Serumproben für HE4 Testung.

Eine Stunde vor Beginn der Testreihe wurden die Serumproben (siehe Abbildung Nr. 1) zum Auftauen bei Raumtemperatur aus dem -80°C Schrank entnommen. Keine Reagenzien verschiedener HE4 Assays wurden vermischt und alle 96 Testmöglichkeiten direkt genutzt. Vor Beginn der Testung muss das bei 8°C im Kühlschrank gelagerte HE4 Kit auf Raumtemperatur gebracht werden.

Zunächst werden die Kalibratoren B-F, Kontrollen 1 und 2, Wasch-Lösung und Tracer Arbeitslösung vorbereitet bzw. hergestellt. Zu den Kalibrator- und Kontrolllösungen werden je 1 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, langsam gemischt und für mindestens 15 Minuten stehen gelassen. Zur Herstellung der Waschlösung werden 50 ml des Waschkonzentrats mit 1200 ml destilliertem Wasser gemischt.



Abbildung 2: Vorbereitete Tracerlösung.

Da bei den Testungen immer alle Vertiefungen gleichzeitig gebraucht werden, muss die Tracerlösung auf einmal hergestellt werden; 600 μl Tracer Anti-HE4 werden mit 12 ml Tracer Verdünnung gemischt (siehe Abbildung 2).

4. Methoden und Materialien

Die Testung beginnt nun mit einer einmaligen Waschung aller Vertiefungen mit der hergestellten Waschlösung. Danach werden nach folgender Reihenfolge je 25 μL der Kalibratoren (Cal A, B, C, D, E und F), der Kontrollen (C1, C2) und der zu testenden Serumproben in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert, nachdem sie nochmals vorsichtig gemischt worden sind (siehe Tabelle Nr. 3).

Tabelle 3: Übersicht über die Anordnung der Kalibratoren auf der Platte.

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	Cal A	Cal E	Probe 1				
B	Cal A	Cal E	Probe 2				
C	Cal B	Cal F	Probe 3				
D	Cal B	Cal F	Probe 4				
E	Cal C	C1	etc.				
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					



Abbildung 3: Waschen der Vertiefungen mit 8-fach Pipette

Zusätzlich werden dann in jede Vertiefung 100 μL Biotin Anti-HE4 gegeben. Darauf folgt die Inkubation auf einer Rüttelplatte bei 850 r/min und Raumtemperatur für 1 Stunde (± 5 min). Nach der Inkubation folgt dreimaliges Waschen mit der Waschlösung aller Vertiefungen mit einer 8-fach Pipette (siehe Abbildung Nr. 3).

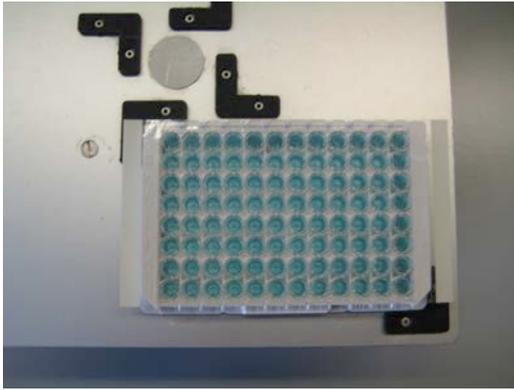


Abbildung 4: Inkubation mit Tracerlösung.

Nach dem Waschen erfolgt eine weitere einstündige (± 5 min) Inkubation mit je 100 μL Tracer Lösung (siehe Abbildung Nr. 4) bei 850 r/min. Es folgt erneutes sechsmaliges Waschen der Vertiefungen.



Abbildung 5: Letzte Inkubation unter Ausschluss von Sonnenlicht.

Im folgenden Schritt werden 100 μL des TMB HRP-Substrat zügig in jede Vertiefung hinzugefügt, wobei zwischen der ersten und letzten Zugabe nicht mehr als 5 Minuten liegen dürfen. Unter Lichtausschluss wird ein letztes Mal für 30 min (± 5 min) inkubiert (siehe Abbildung Nr.5).



Abbildung 6: Spektrophotometer zur Absorptionsmessung.

Danach werden mit einem Spektrophotometer (VersaMAX microplate reader; Molecular Devices, LLC; Sunnyvale, CA / United States) die Absorptionen in den Wells bei 620 nm gemessen (siehe Abbildung Nr.6).



Abbildung 7: Farbumschläge verschiedener Intensität.

Schon mit dem bloßen Auge sind die verschieden intensiven Farbumschläge deutlich zu erkennen (siehe Abbildung Nr. 7).

4.6 Klinische Datenerhebung

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte durch Auswertung vorhandener Arztbriefe aus dem oben erwähnten „KAOS“ Computersystem und im speziellen für das Palliativpatienten-Kollektiv auch aus dem Giessener Tumor Dokumentationssystem „GTDS“. Hier wurde auch der FIM-Score, der täglich von den Schwestern und Pflegern erhoben wird dokumentiert.

Dabei handelt es sich um eine Bewertung verschiedener vom Patienten unabhängig und selbstständig durchführbarer Tätigkeiten wie z. B. Gang zur Toilette, Ankleiden (aufgeteilt in Ober- und Unterkörper), Kämmen, Blasen- und Darmkontinenz etc., aber auch kognitive Dinge wie Gedächtnis, Lösen von Problemen, soziale Interaktion etc., die zu Beginn eines stationären Aufenthaltes erhoben werden, so die nötige Pflegebedürftigkeit des Patienten einordnen und im Verlauf Veränderungen deutlich machen [112].

Die Kreatinin-Clearance wurde mittels der Formel von Cockcroft und Gault berechnet [113]:

$$C_{Cr} = \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht}}{72 \times S_{Cr}} \times (0,85 \text{ falls weiblich})$$

Abbildung 8: Kreatinin-Clearance nach Cockcroft und Gault.

Die prospektive Verfolgung der Palliativ-Patienten erfolgte einerseits bei Anbindung an die Medizinische Klinik V über das KAOS-System. Andererseits wurde auch der behandelnde Hausarzt oder aber der Patient direkt in regelmäßigen Abständen von 3-4

Monaten per Telefon zum aktuellen Gesundheitsstatus und neuen Erkrankungen befragt.

Folgende Daten waren von Relevanz:

Tabelle 4: Auflistung der klinischen Patientendaten.

Klinische Daten		
<u>Allgemeine Daten</u>	<u>Komorbiditäten</u>	<u>Beschreibung des Tumors</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gewicht ▪ FIM-Score ▪ Geschlecht ▪ Tod ▪ Todesursache ▪ Alter ▪ Tag der Blutentnahme ▪ Kreatinin-Clearance 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kardiovaskulär ▪ Chronische Infektionen ▪ Neurologisch ▪ Psychiatrisch ▪ Stoffwechsel ▪ Sonstige 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Entität ▪ Staging nach TNM-System ▪ Metastasenlokalisation ▪ Zweittumoren

4.7 Dokumentation und statistische Auswertung

Die für die Studie erforderlichen Daten wurden mit Hilfe des in der Universitätsklinik Gießen benutzen Computersystems „KAOS“ und des Gießener Tumor Dokumentationsregister „GTDS“ gewonnen. Die Daten beziehen sich auf die derzeitigen und vorherigen Erkrankungen der teilnehmenden Patienten und insbesondere die anamnestischen Ergebnisse und Laborwerte an dem ersten Tag des jeweiligen Studienbeginns. Alle gesammelten Daten wurden in Ordner abgelegt und sicher in einem abschließbarem Raum aufbewahrt. Die Daten wurden mit entsprechender Software (Microsoft Office 2007, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) digital festgehalten und vor der Auswertung anonymisiert.

Die Datenerfassung und Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und die statistischen Analysen wurden mit „PASW Statistics 18 for Windows“ (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt.

Das HE4 Protein sollte zunächst hinsichtlich einer möglichen Nutzbarkeit als Biomarker für die akute Epididymitis evaluiert werden. Da die HE4 Werte nicht normalverteilt waren, wurden die drei verschiedenen voneinander unabhängigen Gruppen (akute Epididymitis, Testalgie und Urolithiasis) mit parameterfreien statistischen Methoden (Kruskal-Wallis-Test) untersucht. Die Änderungen der HE4 Werte im Verlauf wurden mit parameterfreien statistischen Methoden für gepaarte Stichproben analysiert (Friedman-Test).

Danach sollten mögliche Assoziationen zwischen erhöhten HE4 Werten und weiteren klinischen Parametern identifiziert werden. Mögliche Beziehungen zwischen HE4 und weiteren Parametern wurden durch bivariate Analysen mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bewertet.

Nach logarithmischer Umwandlung der HE4 Werte wurden multivariate Regressionsanalysen durchgeführt, um Prädiktoren für erhöhte HE4-Werte zu identifizieren. Mit Hilfe der Receiver Operating Characteristic (ROC) – Kurve wurden die „cut-offs“, Sensitivität und Spezifität für die HE4 Werte zur Vorhersage des Parameters „Tod“ bestimmt. Mit der Kaplan-Meier-Schätzung wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit errechnet. Die statistische Auswertung erfolgt nach initialer statistischer Beratung durch Herrn Dr. J. Pons-Kuehnemann (AG Medizinische Statistik, Institut für Medizinische Informatik, Heinrich-Buff-Ring 44) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Lüdecke und Herrn Dr. Pilatz, Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie.

5. Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv Epididymitis mit den klinischen Parametern CRP, Leukozyten und PSA im Verlauf und mit Berücksichtigung der antibiotischen Therapie

5.1.1 Patientenkollektiv Epididymitis und antibiotische Vorbehandlung

Insgesamt wurden 77 Patienten im Zeitraum von 06/2007 bis 12/2009 rekrutiert. Hierbei war der jüngste Patient 18 und der älteste Patient 88 Jahre alt mit einem Median von 54 und einer Altersspanne von 70 Jahren (Abbildung 9).

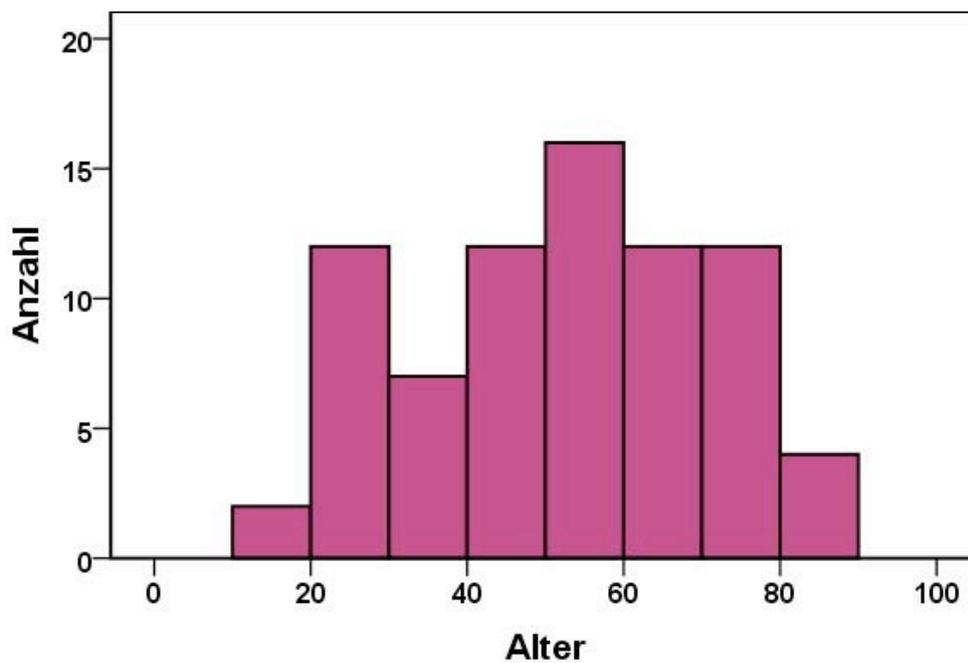


Abbildung 9: Altersverteilung der 77 Epididymitis-Patienten der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 5: Klinische Parameter bei 77 Patienten mit akuter Epididymitis.

Parameter	Median (Spanne)
CRP (mg/dl)	76,5 (0,5-296,2)
Leukozyten (giga/l)	13,4 (3,8-29,6)
Fieber > 38°C (%)	23
Symptombdauer (Tage)	2,5 (0,17-21)
Schmerz-Score*	6,3 (0-10)
Hospitalisierung (Tage)	4,3 (0-17)

*Analogskala: 0 (keine) bis 10 (stärkste) Schmerzen

Von den 77 Patienten waren 26 (34%) antibiotisch vorbehandelt worden. Eine Übersicht über die verschiedenen verabreichten Antibiotika findet sich in Abbildung 10.

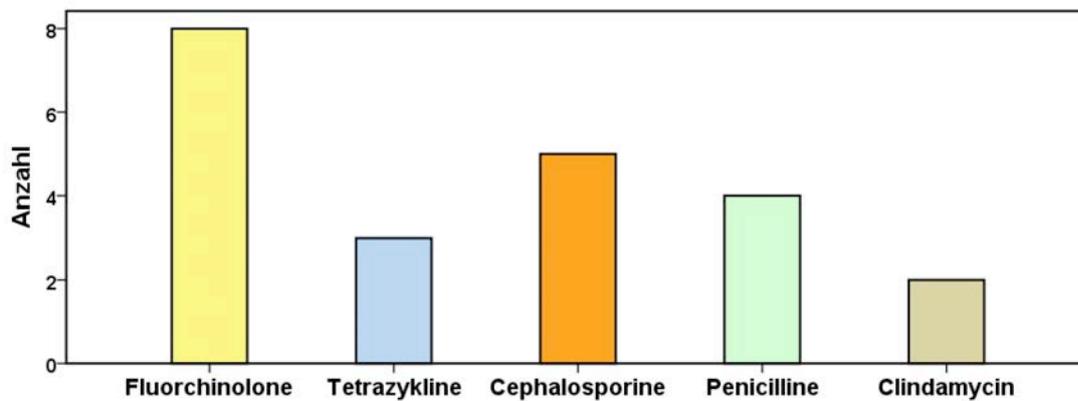


Abbildung 10: Antibiotische Vorbehandlung bei 26 Patienten nach verschiedenen Antibiotikaklassen. Ein Patient erhielt im Vorfeld zwei Antibiotika verschiedener Klassen.

Während sich bei 40 von 51 nicht vorbehandelten Patienten (78%) ein bakterieller Erreger nachweisen ließ, gelang dies nur bei 14 der 26 anbehandelten Patienten (54%) im vorliegenden Kollektiv (Abbildung 11).

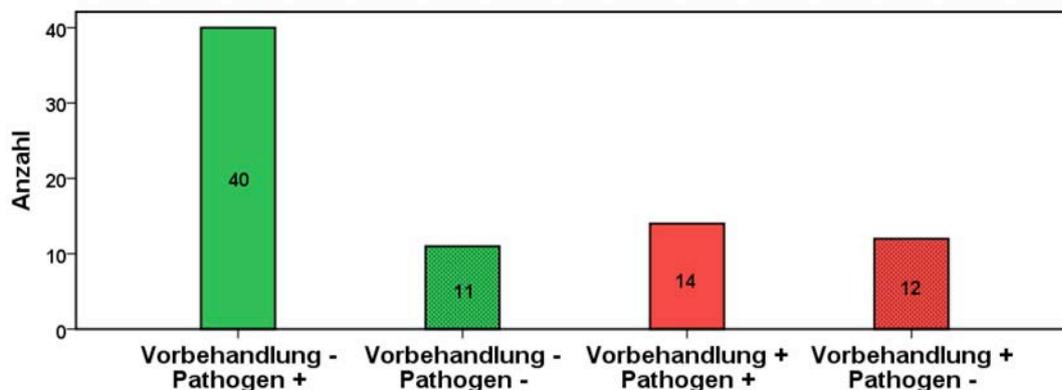


Abbildung 11: Illustration der Erregernachweise bei 77 Patienten mit akuter Epididymitis in Abhängigkeit der antibiotischen Vorbehandlung.

Bei den 40 Patienten mit Erregernachweis ohne antibiotische Vorbehandlung konnten insgesamt 45 Bakterien nachgewiesen werden. Bei den 14 Patienten mit Erregernachweis trotz antibiotischer Vortherapie wurden insgesamt 18 bakterielle Erreger nachgewiesen. Während bei den nicht vorbehandelten Patienten mit akuter Epididymitis in 53% aller identifizierten Erreger *E. coli* ursächlich für die Infektion war, konnte den antibiotisch vorbehandelten Patienten mit Erregernachweis nur 28% aller Fälle *E. coli* zugeschrieben werden. Nach vorheriger Antibiotikatherapie wurden mehr Pseudomonaden und Enterokokken festgestellt. Dies könnte mit den Wirkspektren der benutzten Wirkstoffe („Enterokokkenlücke“ aufgrund Primärresistenz bei Cephalosporinen und vielen Penicillinen) und der in den vergangenen Jahren zunehmenden Antibiotikaresistenzbildung z.B. bei Pseudomonaden erklärt werden [114]. Mittels PCR-Analyse auf die sexuell übertragbaren Erreger ließen sich in der Gruppe der Patienten ohne antibiotische Vorbehandlung 5× *Chlamydia trachomatis*, 3× *Mycoplasma spp.* und 2× *Neisseria gonorrhoeae* nachweisen. *Mycoplasma spp.* konnte in der Gruppe der Patienten mit antibiotischer Vorbehandlung nicht, *Neisseria gonorrhoeae* einmal und *Chlamydia trachomatis* zweimal nachgewiesen werden (Abbildung 12). Insgesamt hatten die sexuell übertragbaren Erreger damit einen etwa gleich großen Anteil von 20% in der Patienten Gruppe ohne antibiotische Vorbehandlung und 21,4% in der Gruppe der Patienten mit antibiotischer Vorbehandlung.

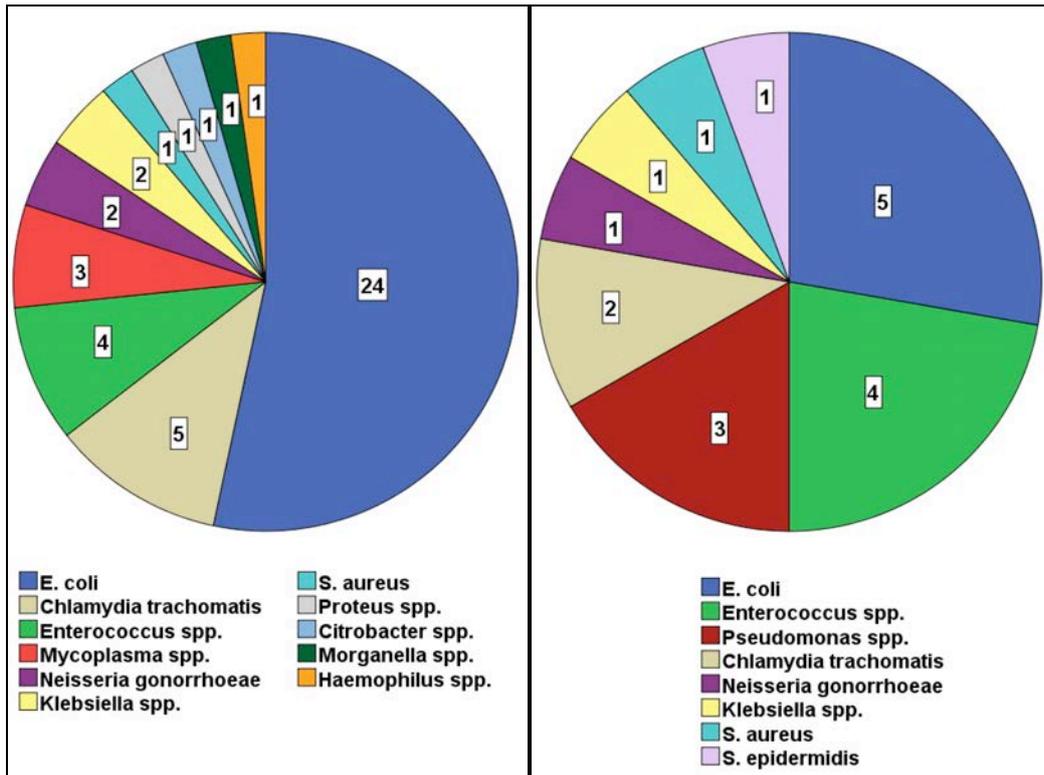


Abbildung 12: Bakteriologisches Erregerspektrum bei A) unbehandelten (n=40) und B) antibiotisch vortherapierten Patienten (n=14).

5.1.2 Leukozyten im Blut im Zeitverlauf

Bei allen 77 Patienten wurden bei Aufnahme die Leukozyten im Blutbild in giga/l bestimmt. Bei insgesamt 50 Patienten lagen jeweils gepaarte Werte bei Aufnahme und den Tagen 14 und 84 vor (Abbildung 13). Da eine Normalverteilung der Werte nicht vorlag, erfolgte die Auswertung mittels Wilcoxon-Test. So hatten die 50 Patienten bei der Aufnahme eine mediane Leukozytose mit 13,7 giga/l, diese normalisierte sich auf 6,7 giga/l an den Tagen 14 und 6,5 giga/l nach 84 Tagen. Während der Unterschied zwischen dem Leukozytenwert bei der Aufnahme und den beiden Kontrollen jeweils signifikant unterschiedlich war (stets $p < 0,001$), fand sich kein Unterschied zwischen den Werten bei den beiden Kontrolluntersuchungen ($p = 0,253$).

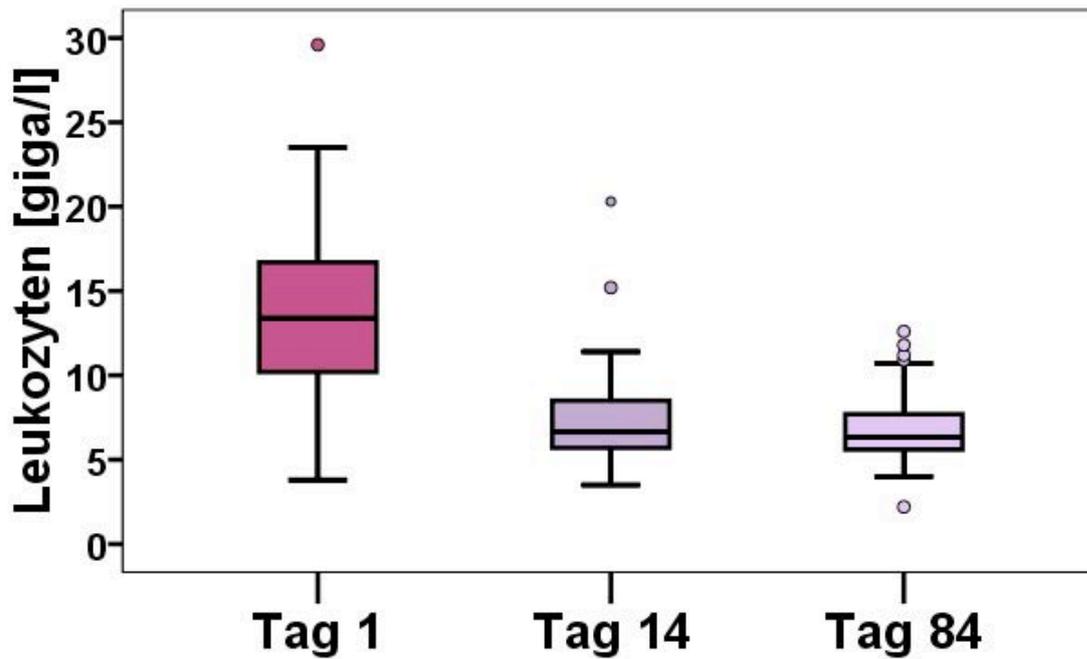


Abbildung 13: Normalisierung der Leukozyten im Blut bei 50 Patienten mit initialer akuter Epididymitis im Zeitverlauf. Signifikante Unterschiede bei Aufnahme und den Kontrollvisiten ($p < 0,001$). Kein Unterschied zwischen Tag 14 und Tag 84 ($p = 0,253$). Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen und Ausreißern.

5.1.3 C-reaktives Protein im Zeitverlauf

Ähnlich zeigte sich das Verhalten des C-reaktiven Proteins. Für 49 Patienten lagen gepaarte Werte für den Tag der Erstvisite und die Kontrollen an den Tagen 14 und 84 vor (Abbildung 14). Es zeigte sich erneut ein Rückgang von 53,2 mg/l (Median) auf 3,4 mg/l an Tag 14 und 2,0 mg/l an Tag 84. Während der Unterschied zwischen dem CRP bei der Aufnahme und den beiden Kontrollen jeweils signifikant unterschiedlich war (stets $p < 0,001$), fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollen ($p = 0,308$).

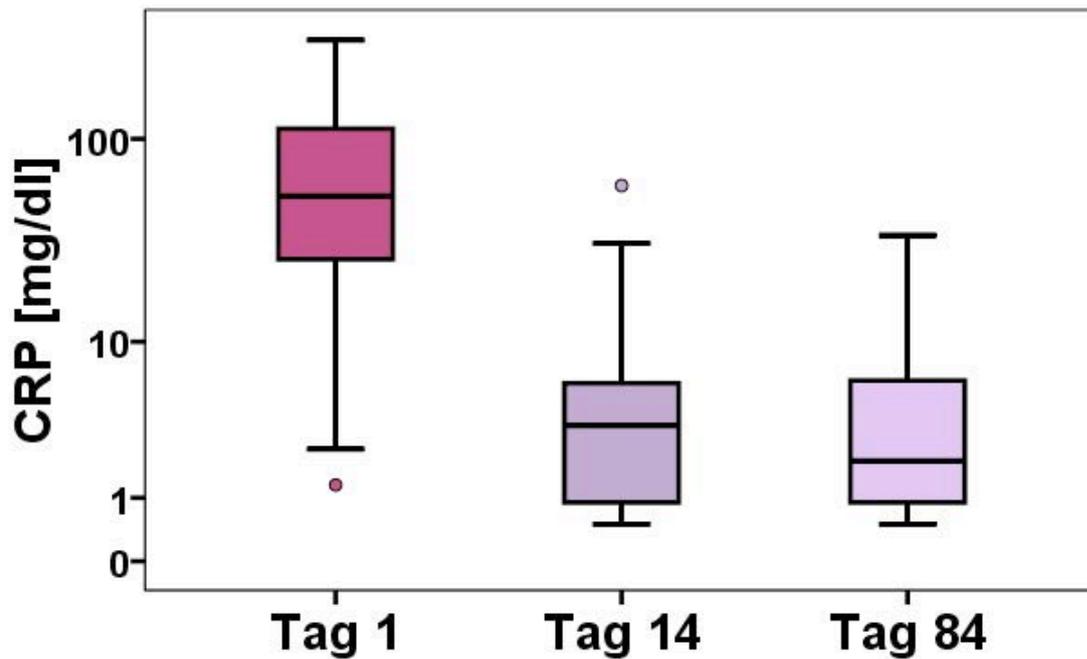


Abbildung 14: Gepaarte CRP-Werte bei 49 Patienten im Zeitverlauf. Signifikante Unterschiede bei Aufnahme und den Kontrollvisiten ($p < 0,001$). Kein Unterschied zwischen beiden Kontrollzeitpunkten ($p = 0,308$). Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen und Ausreißern auf logarithmischer y-Achse.

5.1.4 Prostata spezifisches Antigen (PSA) im Zeitverlauf

Abweichend zu den Infektionsparametern ist die Veränderung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) zu beobachten. Bei 48 gepaarten PSA-Werten zeigte sich eine signifikante stufenweise Reduktion des medianen PSA-Wertes von 2,45 ng/dl bei Aufnahme, 1,64 ng/dl nach 14 Tagen und 1 ng/dl nach 84 Tagen (jeweils $p < 0,001$).

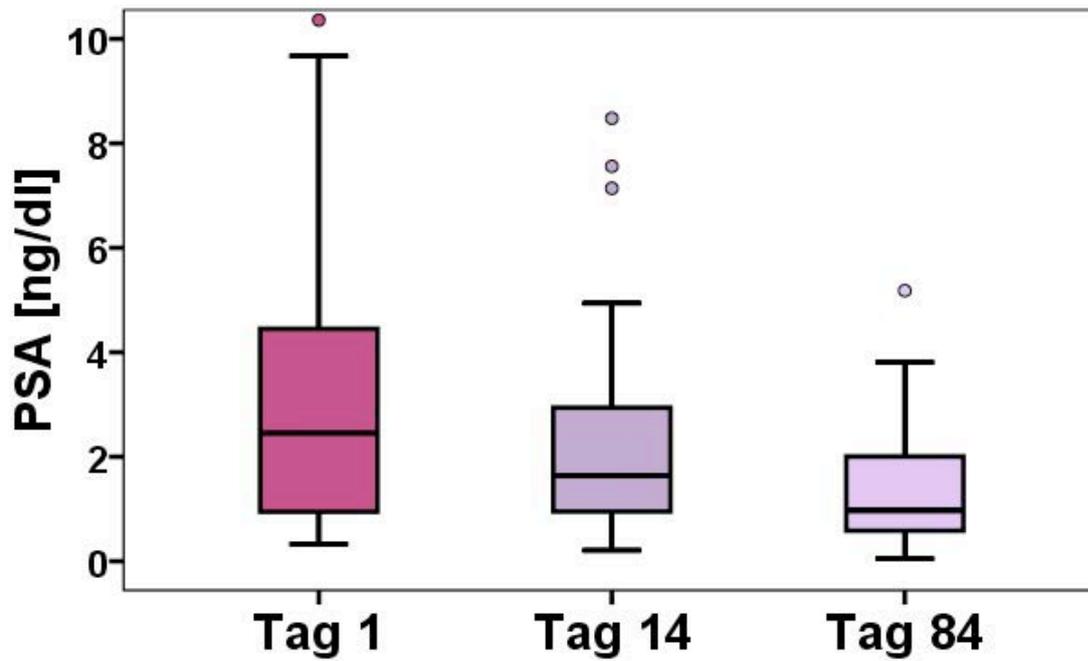


Abbildung 15: Signifikante Abnahme des PSA-Wertes bei 48 Patienten im Zeitverlauf von Visite zu Visite (stets $p < 0,001$). Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen und Ausreißern.

5.2 Kontrollgruppen Testalgie und Urolithiasis

Für die Testalgie - Kontrollgruppe wurden insgesamt 16 Patienten rekrutiert. Hierbei waren der jüngste Patient 25 Jahre und der älteste 54 Jahre alt mit einem medianen Alter von 35,5 Jahren.

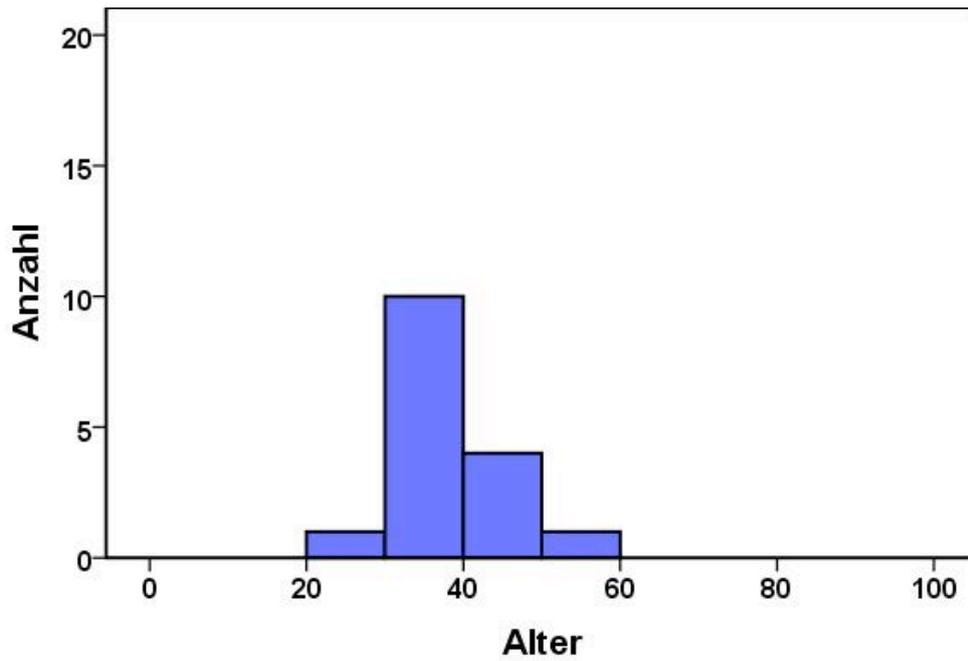


Abbildung 16: Altersverteilung bei der Testalgie – Kontrollgruppe.

Bei der Urolithiasis – Kontrollgruppe konnten insgesamt 20 Patienten rekrutiert werden, wobei der jüngste Patient 26 Jahre und der älteste 67 Jahre alt waren mit einem medianen Alter von 51 Jahren.

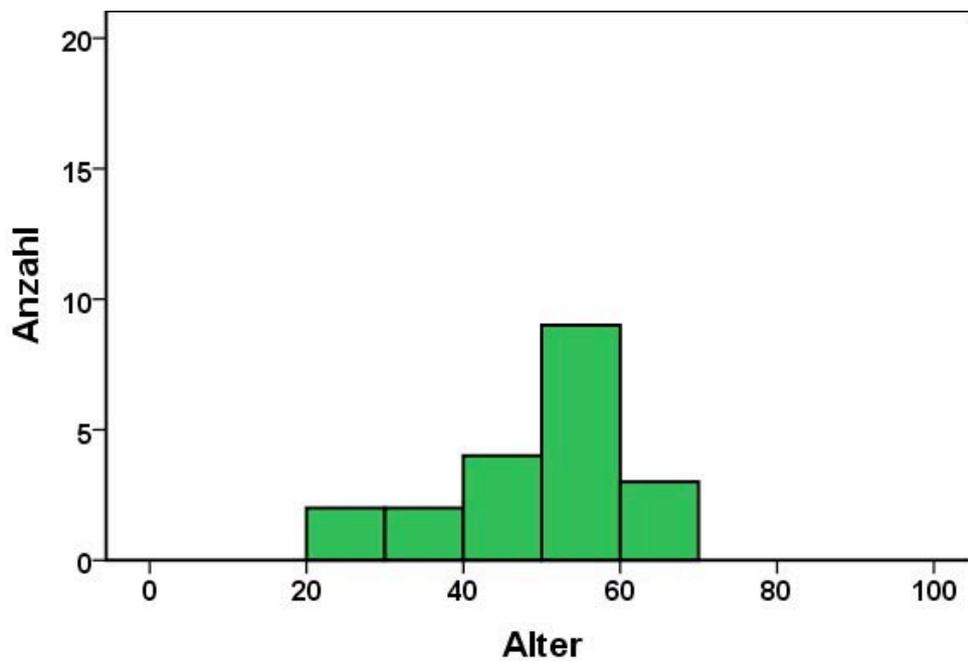


Abbildung 17: Altersverteilung bei der Urolithiasis – Kontrollgruppe.

5.3 HE4 und akute Epididymitis

5.3.1 HE4 im Vergleich mit den Kontrollgruppen Urolithiasis und Testalgie

Bei der ersten Vorstellung hatten die Patienten mit akuter Epididymitis (n=77) eine mediane HE4 Konzentration von 45 pmol/l (Spanne: 4 - 1254 pmol/l). Die Serumkonzentrationen der Patienten mit Urolithiasis (n=20) lagen bei 25 pmol/l (Spanne: 8 - 48 pmol/l) und der Patienten mit Testalgie (n=16) bei 16 pmol/l (Spanne: 2-73 pmol/l). Dieser Unterschied war mittels Kruskal-Wallis-Test auf dem Level $p < 0,001$ statistisch signifikant (Abbildung 18).

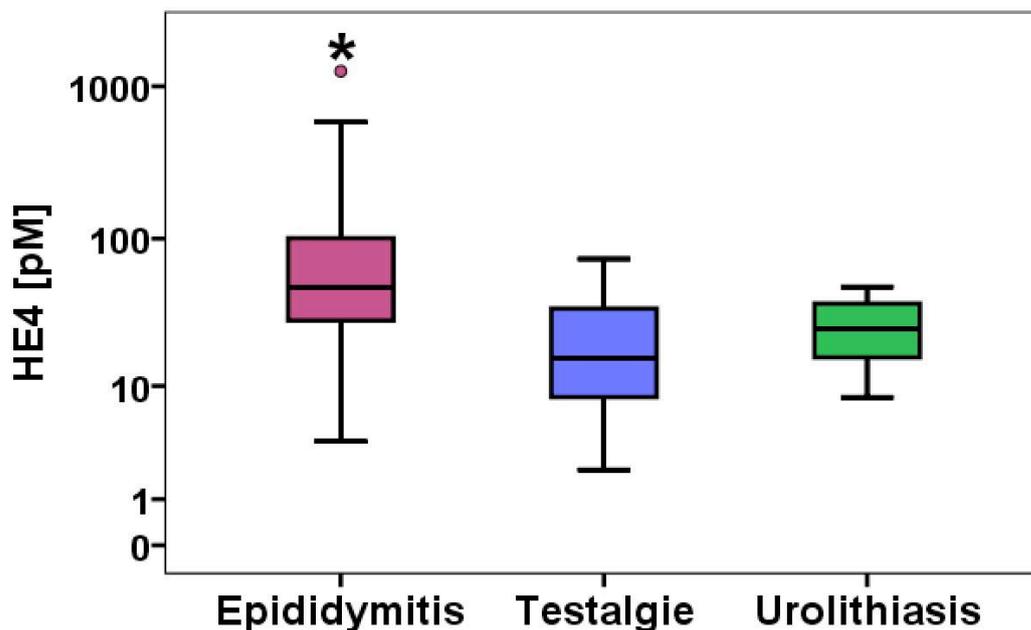


Abbildung 18: HE4-Werte in logarithmischer Darstellung bei 113 Patienten der Gruppen von Patienten mit Epididymitis im Vergleich mit den Gruppen der Patienten mit Testalgie und Urolithiasis. Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen und Ausreißern. HE4-Werte in der Epididymitis-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$).

Vergleicht man nur Patienten ohne Komorbiditäten (Abbildung 19), so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,091$) hinsichtlich der medianen Serum HE4 Werte bei Epididymitis (n=42; 31 pmol/l) im Vergleich mit den Testalgie-Patienten (n=12; 16 pmol/l) und Urolithiasis-Patienten (n=16; 27 pmol/l).

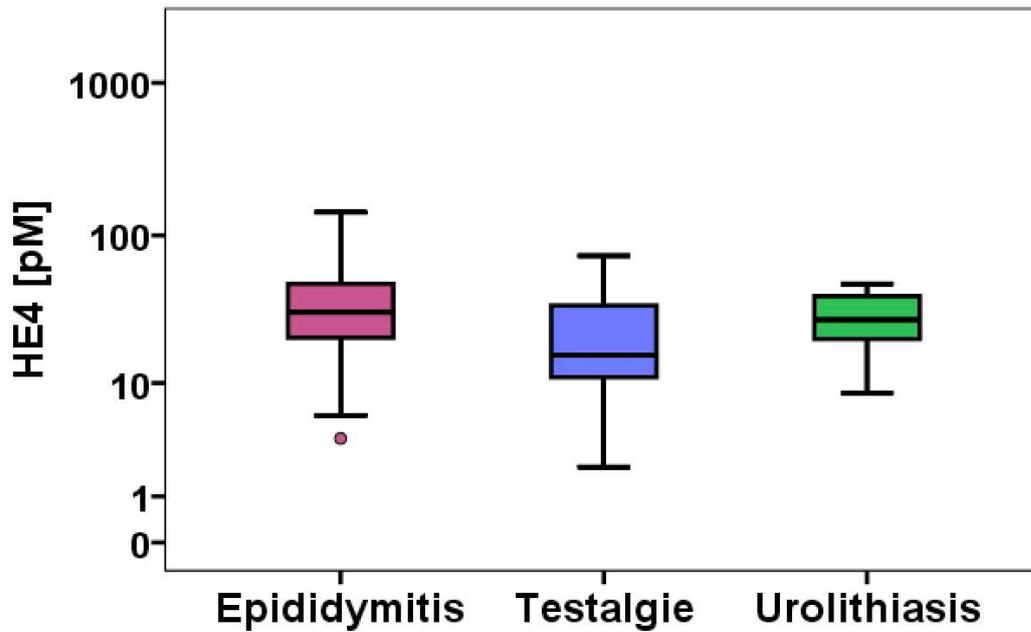


Abbildung 19: HE4-Werte in logarithmischer Darstellung bei Epididymitis-Patienten (n=42) ohne Komorbiditäten im Vergleich mit den Patienten mit Testalgie (n=12) und Urolithiasis (n=16). Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen und Ausreißern.

Desweiteren waren in diesen Gruppen ohne Komorbiditäten alle zusätzlichen Laborwerte wie auch klinisch dokumentierten Daten ohne statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle Nr. 6).

Tabelle 6: Demographische Daten der Patienten und Kontrollgruppen ohne weitere Komorbiditäten (Mediane).

Kollektiv	Anzahl (n)	Alter	Kreatinin (mg/dl)	Kreatinin-Clearance (ml/min)	FIM-Score
Epididymitis	42	40,9	1,07	105,9	126,0
Testalgie	12	37,9	1,01	117,8	125,6
Urolithiasis	16	47,2	0,99	112,3	125,9

5.3.2 HE4 im Vergleich mit klinischen Entzündungsparametern und im Verlauf

Als möglicher Biomarker der akuten Epididymitis interessierte insbesondere der Vergleich zu den standardmäßig im klinischen Alltag gebrauchten Entzündungsparametern wie Leukozyten, Fieber, und C-reaktivem Protein. Zum einen als Hilfestellung bei der Diagnose und Ausschluss von Differentialdiagnosen und zum Anderen als möglicher Parameter zur Verlaufskontrolle der akuten Epididymitis. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante geringe Korrelation mit dem C-reaktiven Protein ($p=0,007$; $r=0,304$). Desweiteren gab es weder eine Korrelation der HE4 Werte mit dem laborchemischen Parameter Leukozyten ($p=0,543$; $r=0,105$), noch mit dem klinischen Parameter Fieber ($p=0,886$; $r=-0,017$). Auch bei der Dauer der ersten Symptome bis zur initialen Vorstellung in der urologischen Ambulanz ($p=0,478$; $r=0,082$) noch beim Schmerz-Score bei der Eingangsuntersuchung ($p=0,123$; $r=-0,178$) gab es Korrelationen.

Schlussendlich zeigte sich bei Patienten mit erhöhten HE4 Werten eine signifikant verlängerte Hospitalisierungsdauer ($p=0,001$; $r=0,370$).

Tabelle 7: Korrelation typischer klinischer Infektionsparameter und HE4 bei Erstvorstellung der Patienten.

Variable	Korrelationskoeffizient	p
C-reaktives Protein	0,304	0,007*
Fieber	-0,017	0,886
Leukozyten im Blut	0,105	0,543
Schmerzscore	-0,178	0,123
Hospitalisierungsdauer	0,370	0,001*
Dauer der Skrotalbeschwerden	0,082	0,478

* signifikant

In der Regressionsanalyse mit schrittweisem Vorgehen zeigte sich, dass initial hohe HE4 Werte mit einer verlängerten Hospitalisierung ($p<0,05$) und einer verringerten Schmerzintensität bei der Erstvorstellung einhergingen ($p<0,05$). Die typischen klinisch als Entzündungsparameter genutzten Parameter CRP, Fieber und Leukozyten blieben jedoch bei den Patienten mit akuter Epididymitis unabhängig von den HE4-Werten (stets $p>0,05$).

Ferner wurden die HE4-Werte bei Patienten mit akuter Epididymitis im Verlauf nach erfolgreicher Therapie an den Tagen 14 und 84 gemessen. Hier lagen insgesamt 39 gepaarte Serumproben vor. Betrachtet man die HE4 Werte bei diesen 39 Patienten über die Zeit an den beiden Wiedervorstellungstagen, so ändern sich die Werte auch nach erfolgreicher konservativer Therapie nicht ($p=0,3$) (Abbildung 20).

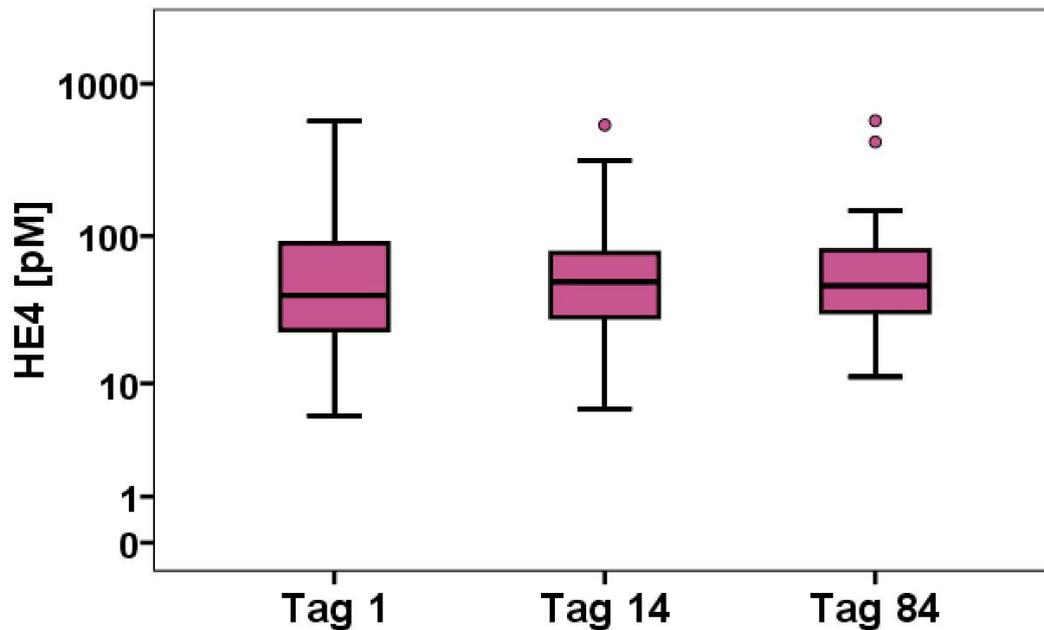


Abbildung 20: HE4 Serumwerte in logarithmischer Darstellung der 39 Patienten mit akuter Epididymitis (Tag 1) und nach erfolgreicher Therapie an den Tagen 14 und 84 ($p=0,3$).

5.3.3 HE4 und assoziierte Komorbiditäten

Um den Einfluss verschiedener Komorbiditäten auf die HE4 Werte zu untersuchen, wurde für alle Patienten ($n=113$) die verschiedenen Erkrankungen mit den HE4 Werten verglichen (Tabelle 8). Dabei zeigte sich mittels Mann-Whitney U test, dass kardiovaskuläre Erkrankungen ($p<0,001$), Tumorerkrankungen ($p<0,01$), metabolische Erkrankungen ($p<0,01$), psychiatrische Störungen ($p<0,05$) und neurologische Erkrankungen ($p<0,01$) eine signifikante Übereinstimmung mit erhöhten HE4 Werten haben. Eine gute Korrelation zeigte sich zwischen HE4 Werten und einem reduzierten FIM-Score, dem Alter und der Nierenfunktion ($p<0,001$) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Einfluss von verschiedenen Erkrankungen und dem Patientenalter auf den HE4-Wert bei 113 Patienten.

Variable	Korrelationskoeffizient	p
Alter	0,618	p<0,001
Kardiovaskuläre Erkrankungen	n.v.	p<0,001*
Chronische Infektionen	n.v.	0,089
Tumorerkrankungen	n.v.	p<0,01*
Metabolische Erkrankungen	n.v.	p<0,01*
Neurologische Erkrankungen	n.v.	p<0,01*
Psychiatrische Erkrankungen	n.v.	p<0,05*
Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance)	-0,574	p<0,001
Nierenfunktion (Serumkreatinin)	0,36	p<0,001
FIM-Score	-0,542	p<0,001

n.v. nicht verfügbar

* Mann-Whitney U test

Bei Einschluss aller Parameter in ein schrittweises Regressionsmodell ergaben sich eine reduzierte Kreatinin-clearance (p<0,001), ein reduzierter FIM-Score (p<0,001), das Vorliegen kardiovaskulärer Komorbiditäten (p<0,001) sowie das Alter (p<0,05) als unabhängige Prädiktoren für erhöhte HE4 Werte. Hingegen waren Tumorerkrankungen, metabolische Erkrankungen, neurologische und psychiatrische Erkrankungen keine unabhängigen Prädiktoren.

5.3.3.1 HE 4 und Nierenfunktion

Beim Vergleich der HE4 Werte mit dem Serum Kreatinin als ein Parameter der Nierenfunktion der Patienten konnte nur eine schwache, jedoch statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden (r=0,360; p<0,001; Abbildung 21).

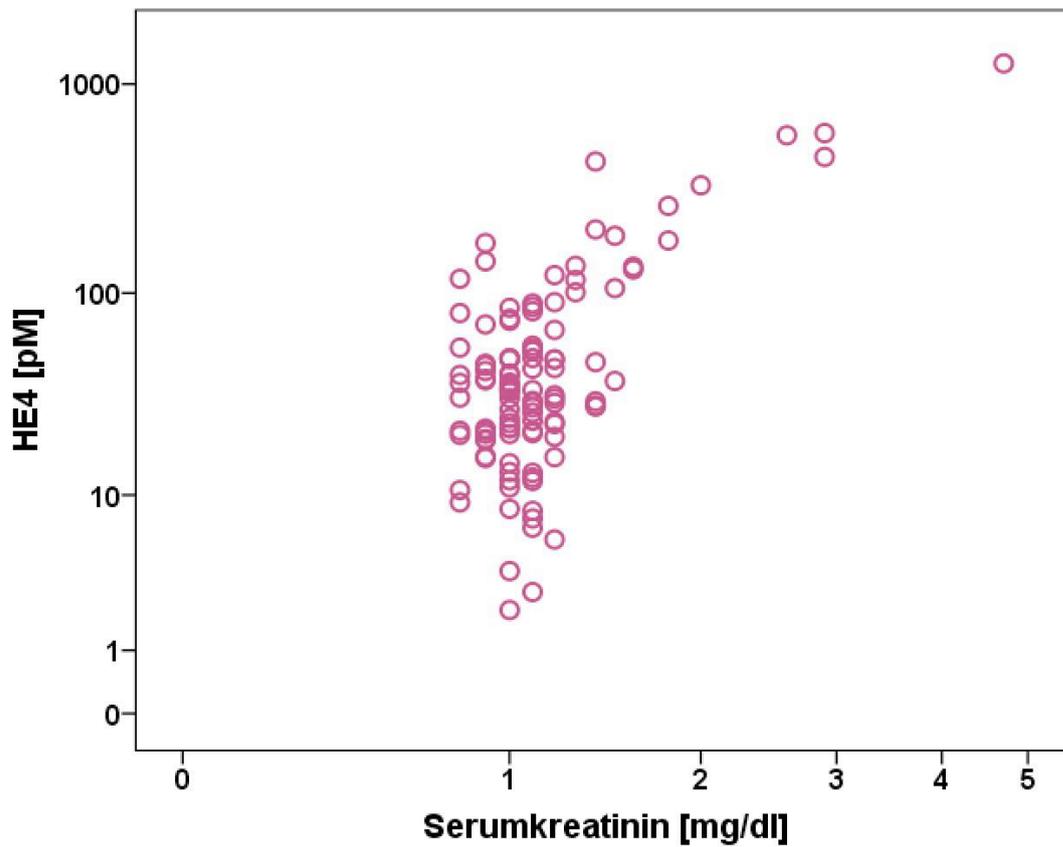


Abbildung 21: Logarithmische Darstellung der HE4 Werte in Bezug auf das Serumkreatinin bei 113 untersuchten männlichen Patienten ($r=0,360$; $p<0,001$). Zu beachten ist die logarithmische Darstellung auf beiden Achsen.

Bei der Errechnung der Kreatinin-Clearance mit der Cockcroft-Gault-Formel zeigte sich eine stärkere Korrelation mit den HE4 Werten ($r=-0,571$; $p<0,001$).

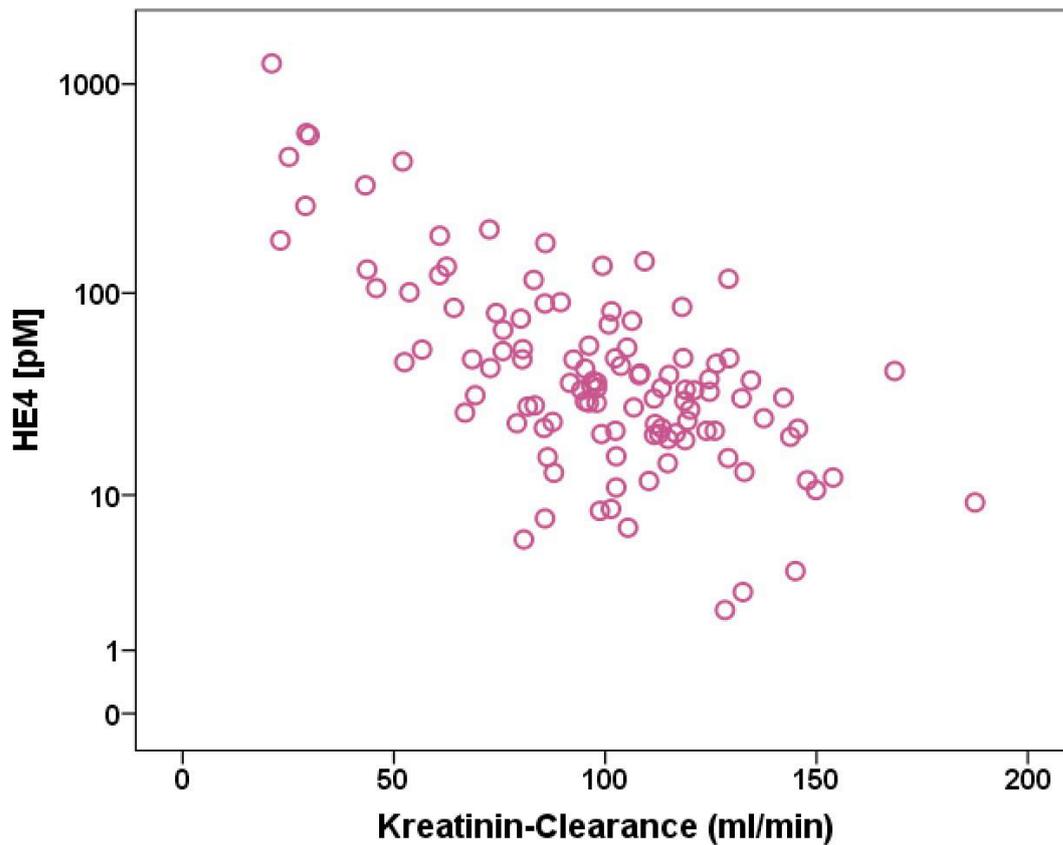


Abbildung 22: HE4 Werte in logarithmischer Darstellung bei 113 untersuchten männlichen Patienten in Bezug auf die Kreatinin-Clearance errechnet entsprechend der Cockcroft-Gault-Formel ($r=-0,571$; $p<0,001$).

Danach wurden die Kreatininwerte der 39 Patienten im Verlauf mit den zwei zusätzlichen Follow-up Tagen 14 und 84 betrachtet und es fanden sich Durchschnittswerte (in zeitlich chronologischer Reihenfolge) von 1,22 mg/dl, 1,12 mg/dl und 1,17 mg/dl. Durch Teilung der HE4 Werte mit diesen Kreatininwerten der jeweiligen verschiedenen Tage, konnte eine Angleichung der HE4 Werte erreicht werden, so dass es erneut keinen Unterschied zwischen Kreatinin-normalisierten HE4 Werten bei Erstvisite und den Follow-up Tagen 14 und 84 gab ($p=0,8$).

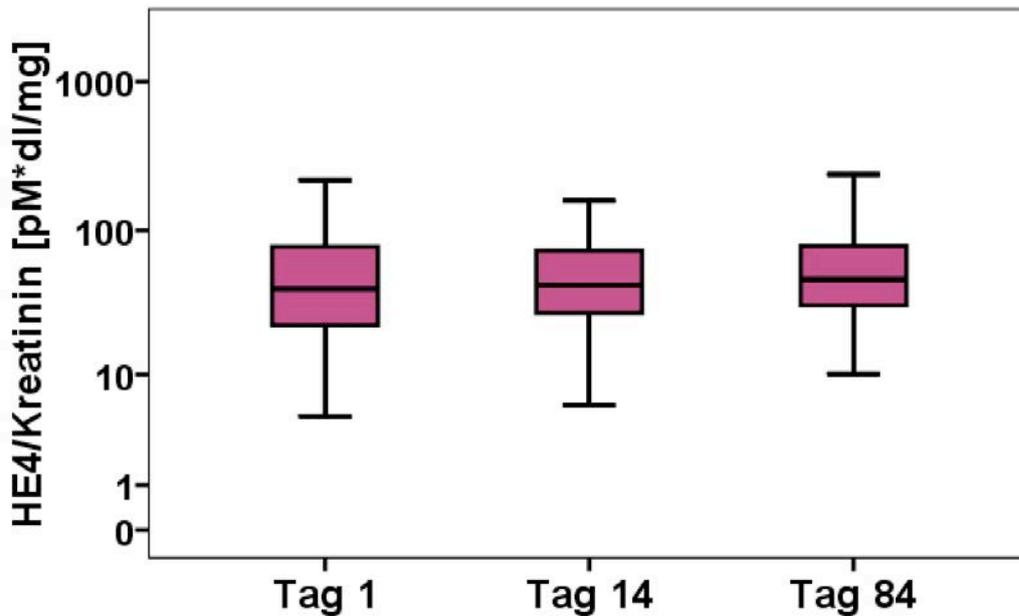


Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der HE4 Werte bezogen auf das Serumkreatinin bei 39 Patienten mit Epididymitis im Therapieverlauf. Keine signifikanten Unterschiede ($p=0,8$).

Schließlich wurden die HE4 Werte in Bezug zu der Gesamtzahl der verschiedenen Erkrankungsgruppen gesetzt. Hier zeigte sich mit zunehmender Anzahl von Komorbiditäten (siehe Tabelle 8) eine signifikante Zunahme der HE4 Werte (Abbildung 24).

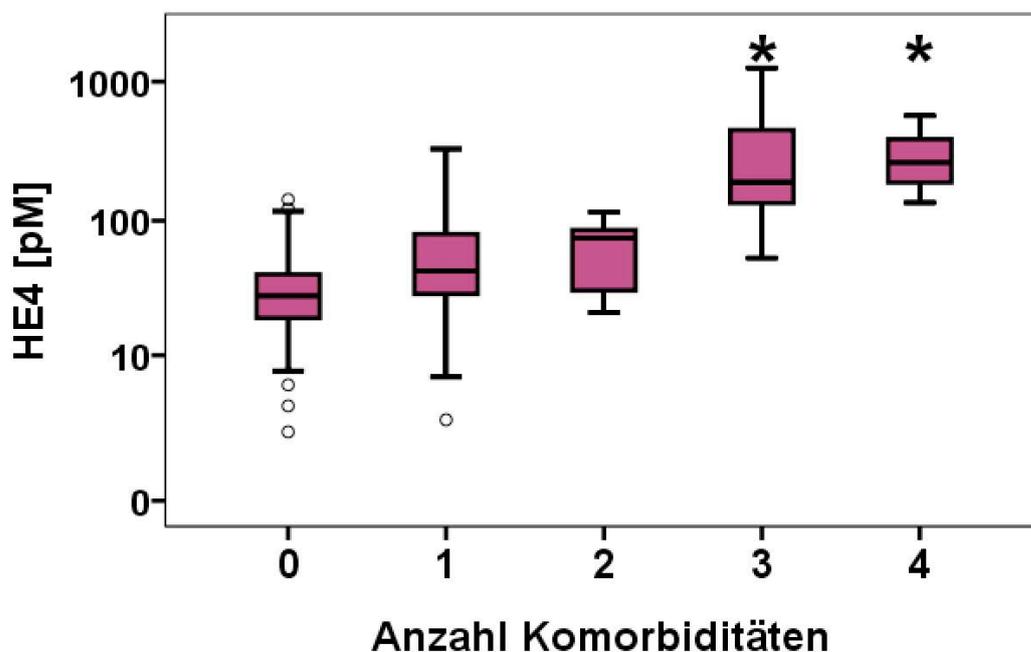


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Assoziation zwischen HE4 Werten in logarithmischer Darstellung und der Gesamtzahl an Komorbiditäten. Signifikante

Zunahme der HE4 Werte mit der Anzahl verschiedener Komorbiditätskategorien (*
 $p < 0,01$).

5.3.4 HE4 in Bezug auf Mortalität und Überlebenschancen

Alle Patienten wurden nach der Erstvorstellung prospektiv beobachtet. Der durchschnittliche Zeitraum betrug 835 Tage (Spanne 101-1557). In diesem Zeitraum starben 11 von 113 Patienten aufgrund verschiedener Gründe wie metastasiertem Pankreaskarzinom, metastasiertem Ösophaguskarzinom, Lungenkarzinom, Pneumonie, kardiovaskulärer Erkrankung, Ileus, Herzinsuffizienz, Hirnblutung, kardiogenem Schock, Dekubitus und multiplen Organversagen. Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen Mortalität und den HE4 Werten ($p < 0,001$) (Abbildung 25).

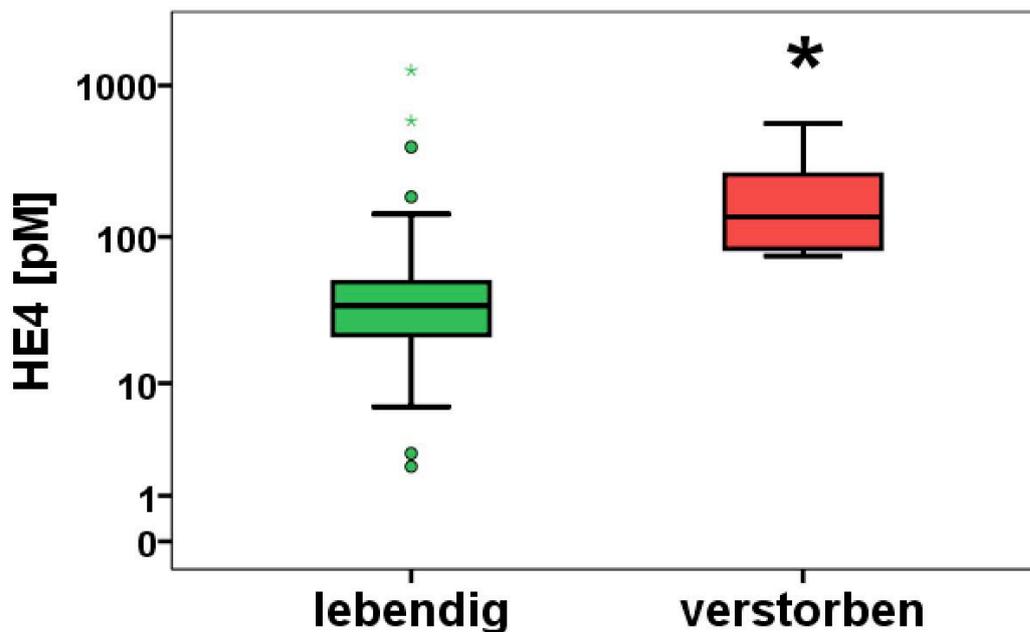


Abbildung 25: Box-Whisker-Plot zeigt die hochsignifikanten Unterschiede der HE4 Werte (in logarithmischer Darstellung) der lebenden Patienten (Median: 34 pmol/l; $n=102$) und der im Follow-up verstorbenen Patienten (Median: 135 pmol/l; $n=11$) (* $p < 0,001$).

Mittels der ROC-Kurven-Analyse wurde ein Cut-off-Wert von 77,5 pmol/l des HE4 Proteins mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 84% für die Voraussagewahrscheinlichkeit „Tod“ ermittelt. Die Fläche unter der Kurve (AUC) betrug 0,914. Alle anderen klinischen Parameter hatten eine ungünstigere Vorhersagewahrscheinlich-

keit bei dem Parameter „Tod“. Lediglich das Patientenalter spielte noch eine wesentliche Rolle. Hier war die AUC 0,902 (Abbildung 26).

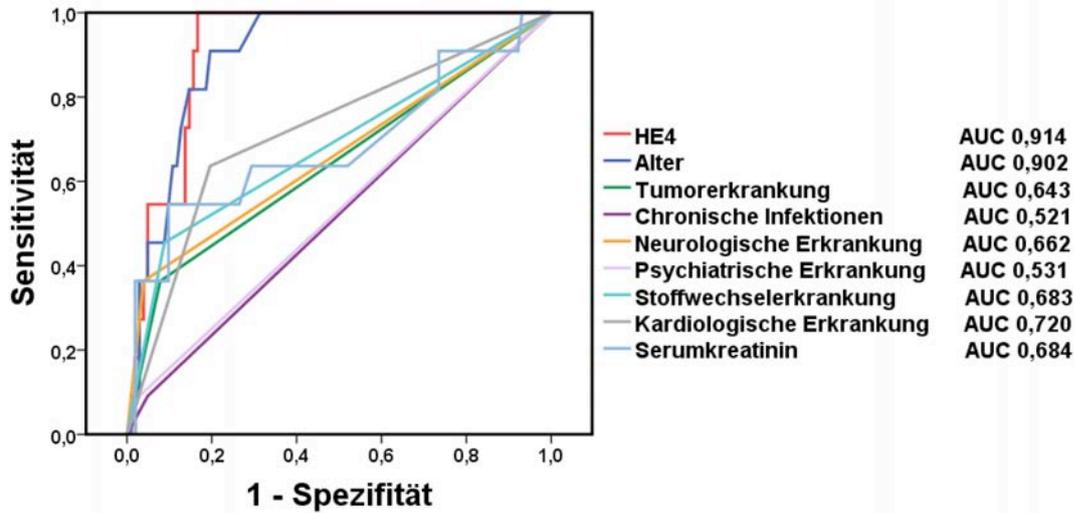


Abbildung 26: Die „area under the curve“ (AUC) identifizierte das HE4 Protein als guten Marker zur Vorhersage „Tod“ (Sensitivität 91%, Spezifität 84%).

Benutzt man nun diesen Cut-off-Wert von 77,5 pmol/l, so finden sich insgesamt 26 Patienten oberhalb und 87 Patienten unterhalb des Wertes. Während von den 26 Patienten oberhalb von 77,5 pmol/l insgesamt 10 Patienten verstarben, ergab sich nur ein Todesereignis bei den 87 Patienten unterhalb des Cut-off-Wertes (Tabelle 9).

Tabelle 9: Darstellung des Überlebens und der Cut-off-Werte.

	Tod	Lebendig	Gesamt
HE4 <77,5 pmol/l	1	86	87
HE4 >77,5 pmol/l	10	16	26
Gesamt	11	102	113

Damit ergeben sich eine Sensitivität von 91%, eine Spezifität von 84%, ein positiv prädiktiver Wert von 38% und ein negativ prädiktiver Wert von 98,8% für die Vorhersage des Todesereignisses. Die Patienten mit höheren Werten als 77,5 pmol/l hatten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 61,5%, während die Patienten mit niedrigeren Werten eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 98,8% ($p < 0,001$) aufwiesen (Abbildung 27).

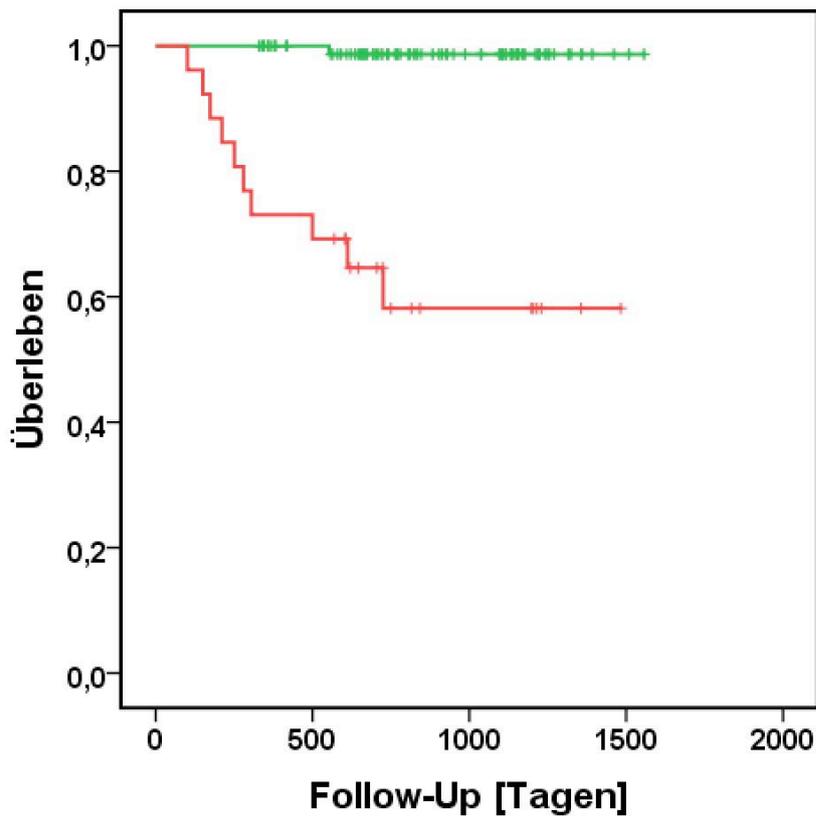


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit erhöhtem HE4 Werten (>77,5 pmol/l, rote Linie) und „normalen“ Werten (<77,5 pmol/l, grüne Linie). Gesamtüberleben 98,8% „normalen“ HE4 Werten und nur 61,5% bei erhöhten HE4 Werten. Signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Zur Optimierung wurden weiterhin die HE4 Werte auf das Serumkreatinin bezogen. Hierfür wurden ebenfalls mittels ROC Kurve der optimalste Wert bezüglich Sensitivität und Spezifität ermittelt. Die AUC lag hier bei 0,917 und der Cut-off Punkt bei 75 pmol/l HE4/Serumkreatinin (Abbildung 28).

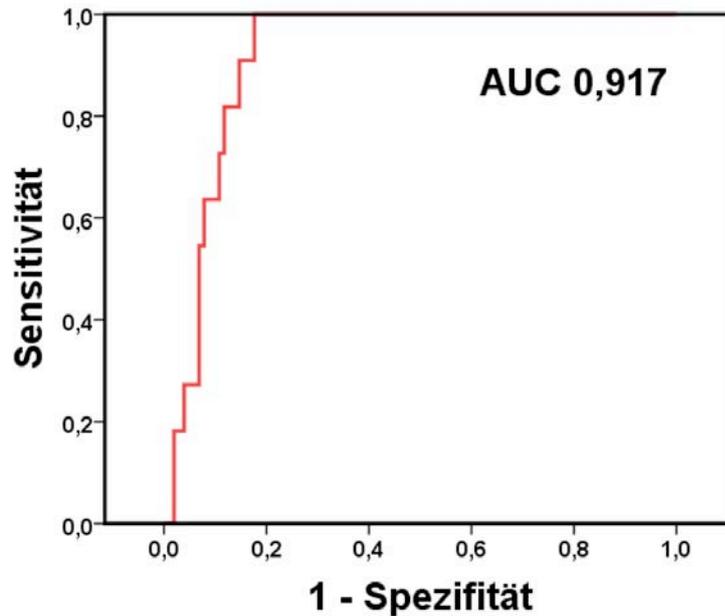


Abbildung 28: Darstellung der ROC Kurve für HE4 pro Serumkreatinin hinsichtlich der Vorhersage des Todesereignisses. Zu beachten ist die AUC von 0,917.

Damit ergibt sich für den Kreatinin-korrigierten HE4 Wert eine Sensitivität von 91%, eine Spezifität von 85%, ein positiv prädiktiver Wert von 40% und ein negativ prädiktiver Wert von 98,8% für die Vorhersage des Todesereignisses bei einem Cut-off Wertes von 75 pmol/l (Tabelle 10).

Tabelle 10: Darstellung des Überlebens anhand des Cut-off Wertes 75 pmol/l für HE4 pro Serumkreatinin.

	Tod	Lebendig	Gesamt
HE4 <75 pmol/l/mg/dl	1	87	88
HE4 >75 pmol/l/mg/dl	10	15	25
Gesamt	11	102	113

5.4 Palliativ-Kollektiv

Nach Auswertung der Patientenakten stellte sich heraus, dass 19 Patienten nicht palliativ erkrankt waren und somit nur 100 Patienten zu der Palliativ-Gruppe gehören. Um bei den 100 palliativen Patienten repräsentative Gruppengrößen bezüglich der Erkrankungen zu gewährleisten, wurden Gruppen mit gleicher Tumorentität und einer

Patientenzahl von größer als sieben Patienten sowie Patienten mit sonstigen Tumorentitäten in eine eigene Untergruppe eingeschlossen, so dass am Ende sechs Gruppen verschiedener Tumor-Entitäten aus Lunge, Prostata, Niere, Rektum, HNO und Sonstige entstanden sind (Abbildung 29).

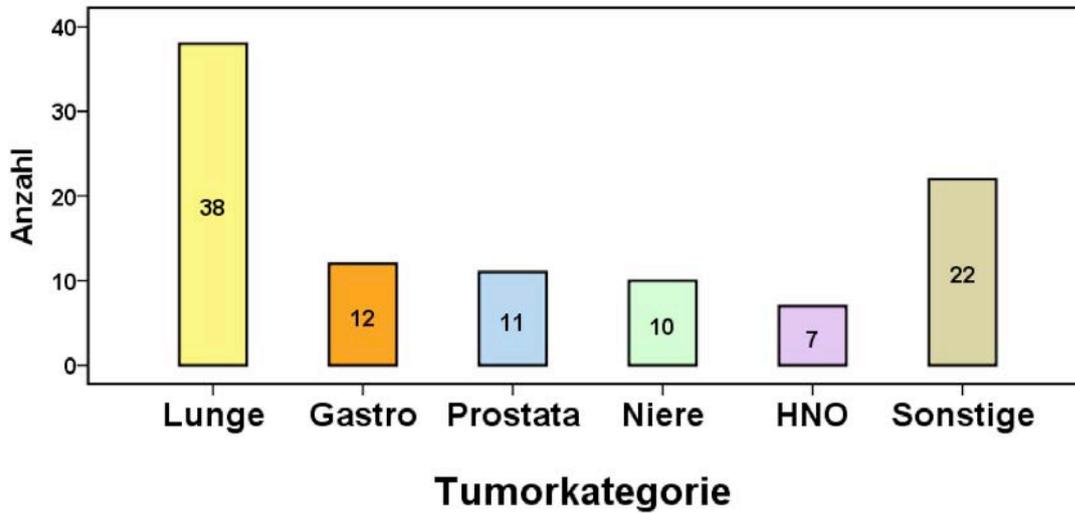


Abbildung 29: Anzahl der sechs verschiedenen Tumorentitäten.

Tabelle 11: Beschreibung der Patientenkollektive.

	Tumorentität	Patientenzahl	Verteilung: w/m
Patientengruppe	Lunge	38	10/28
	Prostata	11	0/11
	Niere	10	1/9
	Gastro	12	4/8
	HNO	7	2/5
	Sonstige	22	14/8

Bei den 100 Patienten war der jüngste 38 und der älteste 88 Jahre alt bei einem Median von 67,0 und einer Geschlechterverteilung Frauen zu Männer von 1 : 2,2 (siehe Tabelle 11 sowie Abbildung 30).

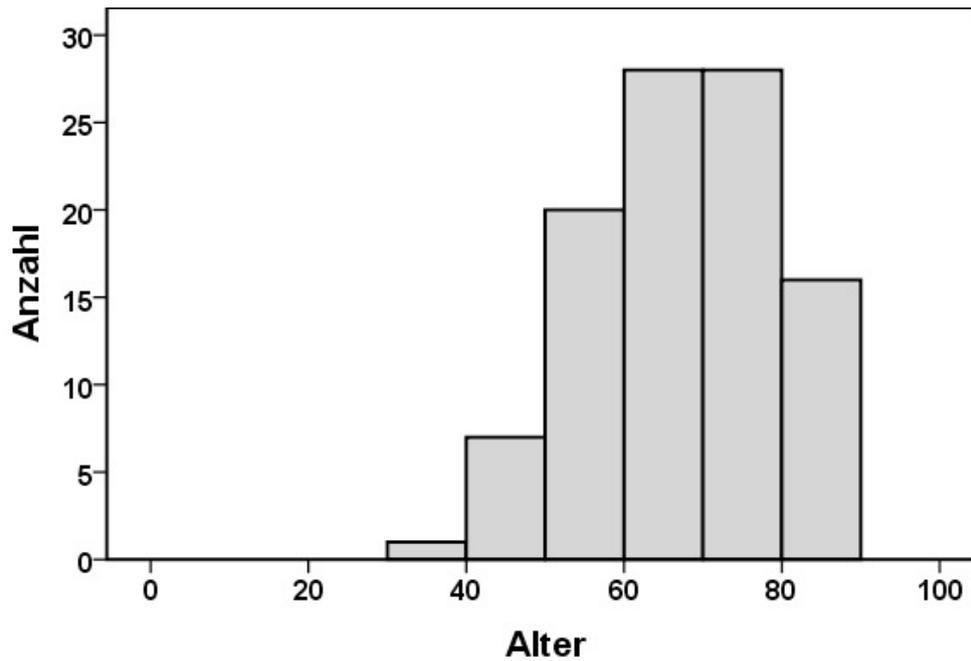


Abbildung 30: Altersverteilung der 100 Palliativpatienten.

5.5 HE4 im Palliativ-Kollektiv

Die Blutproben der „Palliativ-Gruppe“ wurden einmalig am Vorstellungstag abgenommen und untersucht. Hier zeigten sich bei den 100 Patienten eine durchschnittliche Konzentration von 172,458 pmol/l (Spanne: 21,33 – 1205,40 pmol/l). Zunächst sollte geklärt werden, ob die HE4-Werte der verschiedenen Tumorgruppen signifikante Unterschiede aufweisen. Dies wurde mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet. Hierbei ergab sich mit einem $p=0,647$ kein signifikanter Unterschied der HE4-Werte zwischen den einzelnen Tumorentitäten (Abbildungen 31).

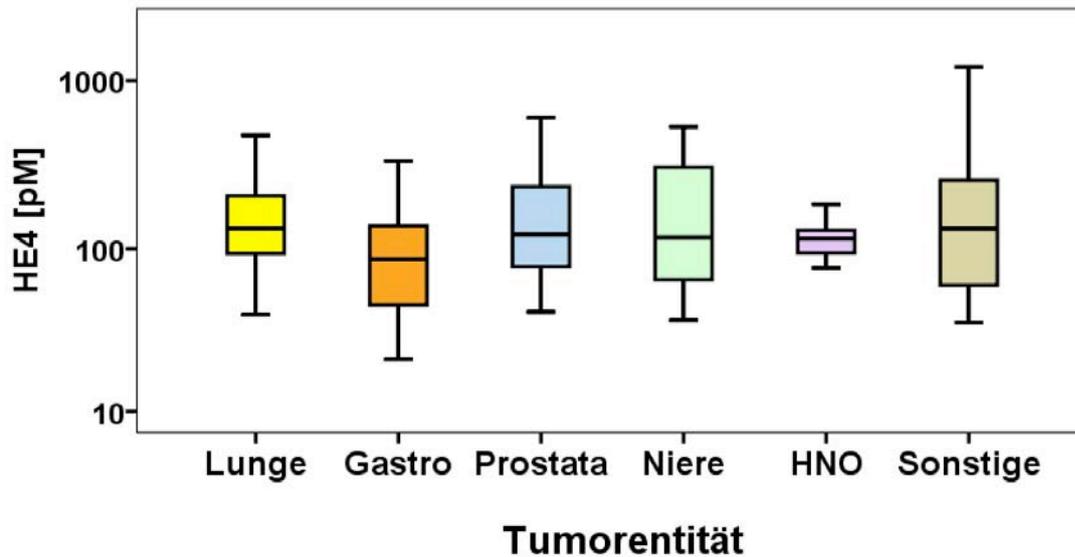


Abbildung 31: HE4 Werte (in logarithmischer Darstellung) in den verschiedenen Tumorentitäten ohne signifikanten Unterschied ($p=0,647$). Whisker-Boxplots mit Darstellung von Median, Quartilen.

Die medianen HE4 Werte der verschiedenen Patientengruppe sowie die Geschlechtsverteilung zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: Verschiedene Parameter der Palliativgruppe.

	Tumor-entität	Patienten-zahl	HE4-Median	Verteilung : w/m
Patienten-gruppe	Lunge	38	132,4 pmol/l	10/28
	Prostata	11	121,8 pmol/l	0/11
	Niere	10	116,9 pmol/l	1/9
	Rektum	9	86,8 pmol/l	4/5
	HNO	7	114,8 pmol/l	2/5
	Sonstige	25	131,5 pmol/l	14/11

5.5.1 HE4 in Assoziation zur Nierenfunktion im Palliativkollektiv

Ähnliche Resultate hinsichtlich der HE4-Werte in Bezug auf die Nierenfunktion wie unter 5.3.3.1 beschrieben, ergaben auch die Analysen in dem Palliativkollektiv. Hier zeigte sich eine signifikante ($p < 0,001$) Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,390$ (zum Vergleich: Epididymitis-Kollektiv $r = 0,360$)

Bei der Berechnung der Korrelation der HE4-Werte in Bezug auf die mit der Cockcroft-Gault-Formel errechneten Kreatinin-Clearance, zeigte sich eine signifikante Korrelation ($r = -0,483$, $p < 0,01$, Abbildung 32).

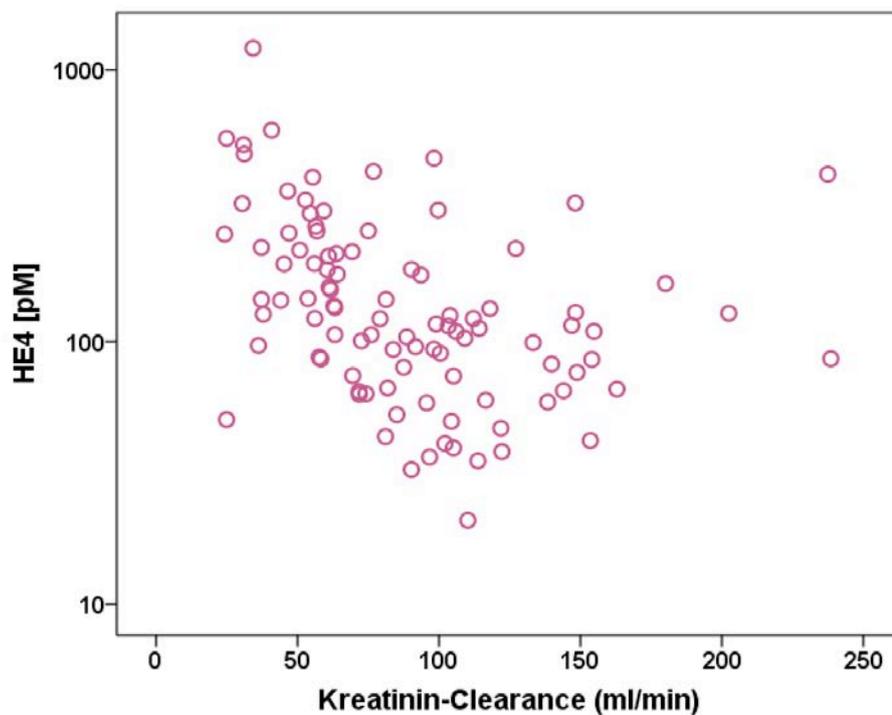


Abbildung 32: Logarithmische Darstellung der HE4-Werte in Bezug auf die Kreatinin-Clearance im Palliativ-Kollektiv von 100 Patienten ($p < 0,001$; $r = -0,483$). Zu beachten ist die logarithmische Darstellung der HE4 Werte auf der Y-Achse.

5.5.2 HE4 und Effekte auf mögliche Metastasierung

Bei allen 100 Patienten im Palliativ-Kollektiv wurden auch die während des Aufnahme- tags vorhandenen und zusätzlich während der prospektiven Beobachtungszeitraum hinzugekommenen Metastasierungen dokumentiert und in Bezug auf die HE4-Werte bezüglich möglicher Beziehungen ausgewertet. Dabei wurden die Metastasierungen in neun verschiedene Untergruppen aufgeteilt: Zweit-Karzinom, Lymphknoten-, Leber-, Knochen-, Lunge-, Nebenniere-, Pleura-, Hirn- und sonstige Metastasierung. Im Durchschnitt kamen dabei auf jeden Patienten 1,88 Metastasierungen. Eine Mengenverteilung der verschiedenen Prädilektionsorte zeigt Abbildung 33.

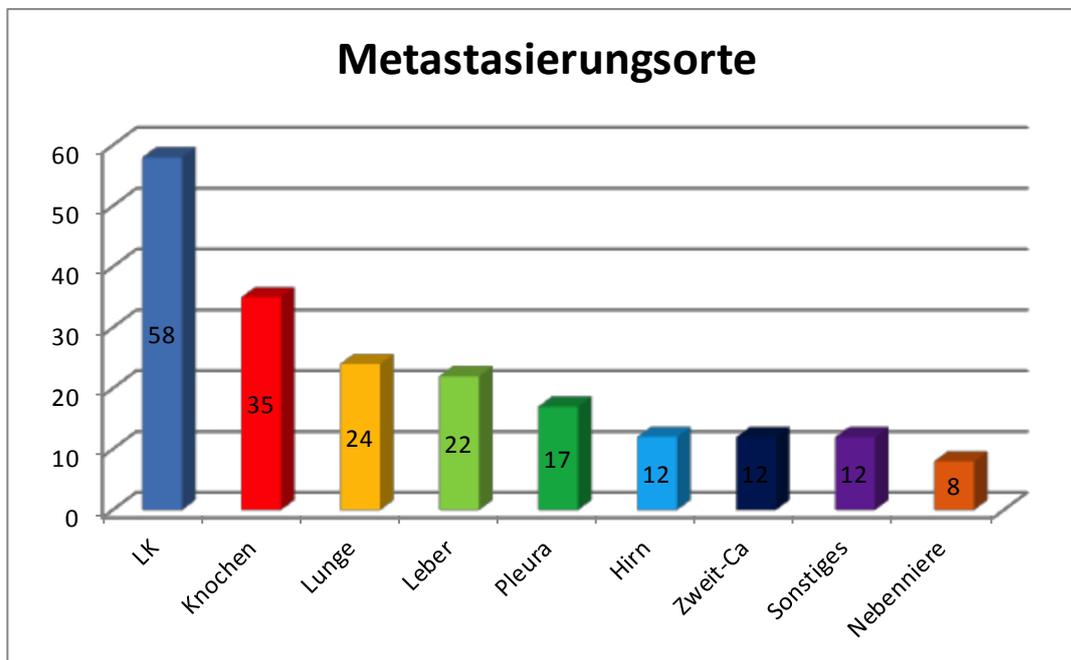


Abbildung 33 zeigt die neun Prädilektionsorte in abfallender Reihenfolge.

Es stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Prädilektionsorte einen Einfluss auf HE4-Werte haben. Dies wurde mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert und zeigte, dass keine der neun Gruppen verschiedener Prädilektionsorte einen signifikanten Effekt auf HE4 hatte (stets $p > 0,05$). Die Ergebnisse wurden auch in der multivariaten Analyse bestätigt (stets $p > 0,05$).

5.5.3 Korrelationen der HE4-Werte mit Komorbiditäten im Palliativ-Kollektiv

Mögliche Effekte von Komorbiditäten, Alter und Geschlecht der Patienten auf die HE4 Werte in der Palliativpopulation wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bzw. Korrelationsanalyse untersucht (Tabelle 13). Hier zeigten sich signifikante Assoziationen nur mit der Kreatinin-clearance ($p < 0,001$), Alter ($p < 0,01$) und dem FIM-score ($p < 0,05$).

In der multivariaten Regressionsanalyse dagegen, war nur eine reduzierte Kreatinin-Clearance ($p < 0,01$) wesentlicher Prädiktor für erhöhte HE4 Konzentrationen (Tabelle 13). Keinen wesentlichen Einfluss hatten die verschiedenen anderen Komorbiditäten.

Tabelle 13 zeigt die verschiedenen Komorbiditäten in Beziehung zu HE4 in der univariaten und multivariaten Analyse.

Komorbiditäten	Anzahl	p univariat	p multivariat
Neuro	8	0,280 [#]	0,323
Psych	7	0,080 [#]	0,767
Stoffwechsel	34	0,839 [#]	0,483
Kardio	56	0,380 [#]	0,545
Sonstiges	22	0,424 [#]	0,242
Nierenfunktion*	100	0,001	0,040
Patientenalter	100	0,007	0,913
FIM-Score	100	0,027	0,087

[#]Mann-Whitney U test

*Kreatinin-Clearance

5.5.4 Die HE4-Werte des Palliativkollektivs in Bezug auf Mortalität und Überlebenswahrscheinlichkeit sowie Identifikator von Risikopatienten.

Bei der Verwendung des zuvor an dem Patientenkollektiv der Epididymitis-Patienten und Kontrollen ermittelten Cut-off von 77,5 pmol/l, liegen 75% der Palliativ-Patienten

bezogen auf die HE4 Werte über dem Cut-off und versterben tendenziell früher als die Patienten mit niedrigeren HE4 Werten ($p= 0,137$, Abbildung 34A). Bei Verwendung des zuvor berechneten Cut-off-Wertes von HE4 in Bezug auf das Serumkreatinin, liegen 85% der Palliativpatienten mit den HE4 Werten über dem Cut-off von 75 pmol/l/Serumkreatinin. Die unterhalb des Cut-off-Wertes liegenden Patienten haben dann eine mit $p<0,05$ signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit (Abbildung 34B).

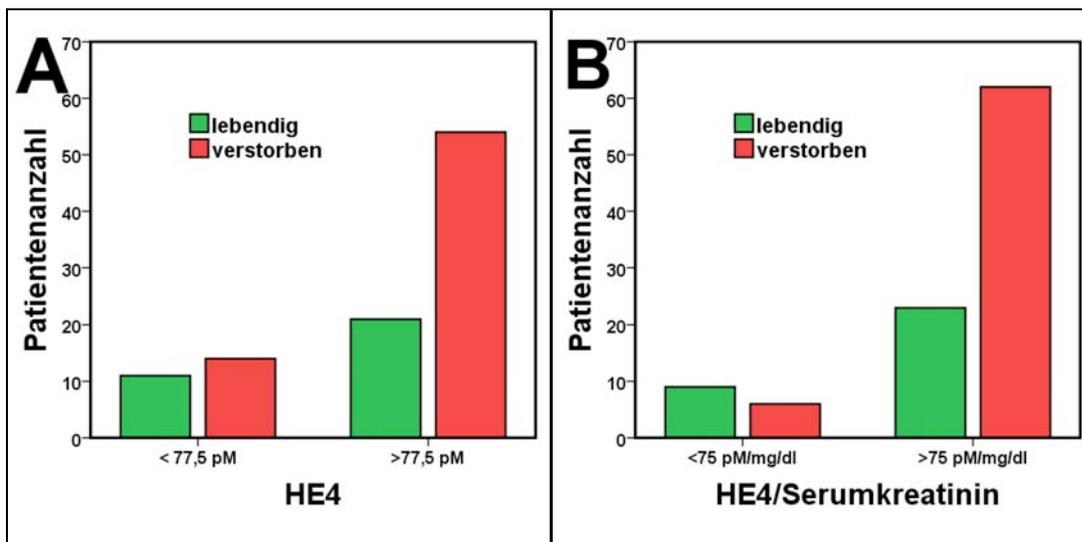


Abbildung 34: In A) graphische Darstellung der verstorbenen ($n=68$) und noch lebenden ($n=32$) Patienten anhand des in der Epididymitisgruppe ermittelten HE4 Cut-off-Wertes von 77,5 pmol/l. B) Gleiche Darstellung, unter Verwendung des zuvor ermittelten Cut-off-Wertes von 75 pmol/l / Serumkreatinin. Hier signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen ($p<0,05$).

6. Diskussion

6.1 Das HE4 Protein als Entzündungsmarker der akuten Epididymitis

Die akute Epididymitis wird meist durch aufsteigende Infektionen, ausgehend von einer Urethritis oder Zystitis, hervorgerufen [36]. Klinisch beginnt die Erkrankung mit skrotalen Schmerzen, begleitet von einem geschwollenen Nebenhoden. Bei vielen Patienten kann man zusätzlich Zeichen wie Fieber, Leukozytose und ein erhöhtes CRP finden. Doehn et al. konnten 2001 dem CRP bei der akuten Epididymitis eine hohe Sensitivität und Spezifität von über 90% zuschreiben [63]. Doch gerade bei jungen Männer ist die Differentialdiagnose und Abgrenzung zur Hodentorsion oftmals schwierig. Eine fehldiagnostizierte Hodentorsion führt in vielen Fällen zu gerichtlichen Prozessen [115]. Leider gibt es bis heute noch keinen spezifischen Biomarker für die akute Epididymitis, der zur Diagnose und Verlaufskontrolle benutzt werden könnte.

Das Bestreben dieser Arbeit war daher herauszufinden, ob das HE4 Protein sich als Biomarker zur Diagnose oder als Verlaufsparemeter bei Patienten mit akuter Epididymitis einsetzen lässt. Das HE4 Protein wurde deshalb evaluiert, weil es ursprünglich als Nebenhoden spezifisches Protein beschrieben worden ist [75], und mutmaßlich eine Rolle in der angeborenen Immunität spielt [116]. Seit kurzer Zeit wird das HE4 Protein auch als Tumormarker für Ovarial-Tumore benutzt [117]. So wurde im September 2011 der HE4 Test (Fujirebio Diagnostics, Malvern, Pennsylvania) von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) in Verbindung mit dem bereits in der Klinik verankerten Tumormarker CA125 zur Rezidiv- und Verlaufskontrolle des Ovarialkarzinoms zugelassen [118, 119].

Unsere Studie zeigt, dass das HE4 Protein nicht als Marker für eine Entzündung und im speziellen nicht als Marker für die akute Epididymitis zu verwenden ist. Betrachtet man den HE4-Median während der akuten Entzündungsphase bei den Epididymitis-Patienten (39 pmol/l) und vergleicht ihn mit denen der Kontrollgruppen (Urolithiasis (29 pmol/l) und Testalgie (24 pmol/l) (alle Patienten ohne weitere Komorbiditäten)), so gibt es dort keinen signifikanten Unterschied. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen von Xi et al. überein. In dieser Studie wurden bei 60 gesunden Kontrollen die Serum-HE4-Werte mit einer Durchschnittskonzentration von 37 pmol/l bestimmt [105]. Mit einer Durchschnittskonzentration von 35,4 pmol/l bei gesunden Frauen kamen Moore et al. ebenfalls auf vergleichbare Ergebnisse [120]. Des Weiteren konnten wir

zeigen, dass auch nach erfolgreicher Therapie der akuten Epididymitis die HE4 Werte zu Beginn der Erkrankung und an den Wiedervorstellungstagen 18 und 84 völlig unverändert blieben. Im Gegensatz dazu normalisierten sich die typischen Entzündungsparameter wie CRP, Fieber und Leukozyten im Laufe der Behandlung, womit wir auch mittels Regressionsanalysen zeigen konnten, dass sich das HE4 Protein unabhängig von diesen Parametern verhält. Zusammenfassend kann man also sagen, dass HE4 Serumwerte keiner Beeinflussung durch eine akute Epididymitis unterliegen. Eventuell könnte hier das Serumkreatinin als Störfaktor agieren, denn gerade im Anfangsstadium der akuten Epididymitis tendierten die Patienten zu eher höheren Serumkreatininwerten als nach der erfolgreichen Behandlung, was jedoch statistisch nicht signifikant war und ebenfalls nicht die Ergebnisse bezüglich der Brauchbarkeit des HE4 Protein als ein Marker für die akute Epididymitis in Frage stellte. Zu der Elimination des HE4 Proteins und der daraus resultierenden Besonderheiten wird nachfolgend (siehe 6.3.2.1) noch ausführlich Stellung genommen.

6.2 HE4 bezogene Korrelationen in beiden Patientenkollektiven

Interessanter Weise hatten die Patienten mit erhöhten HE4 Werten eine verlängerte Hospitalisierungsdauer und hatten des Weiteren einen niedrigeren Wert bei der Messung des FIM-Scores (functional independence measure), was den Ausschlag dazu gab, genauer die zusätzlich zugrundeliegenden Erkrankungen bzw. Komorbiditäten der Patienten zu untersuchen und mögliche Korrelationen und deren Beeinflussung des HE4 Protein zu ermitteln. Dazu teilten wir die verschiedenen Komorbiditäten in insgesamt 6 Kategorien ein: kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Infektionen, metabolische Störungen, neurologische Störungen, psychiatrische Störungen und maligne Veränderungen. Mittels linearer Regressionsanalyse stellte sich heraus, dass die malignen Veränderungen und die psychiatrischen Störungen nicht mit erhöhten HE4 Werten assoziiert waren, während kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Infektionen, metabolische Störungen und neurologische Störungen unabhängige Prädiktoren für erhöhte HE4 Werte waren. In der multivariaten Regressionsanalyse zeigte sich, dass eine reduzierte Kreatininclearance ($p < 0,001$), ein reduzierter FIM-Score ($p < 0,001$), das Vorliegen kardiovaskulärer Komorbiditäten ($p < 0,001$) sowie das Alter ($p < 0,05$) Prädiktoren für erhöhte HE4 Werte sind. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Bolstad et al. bei der Unter-

suchung einer gesunden nordischen Population von insgesamt 1591 Menschen mit der Intention Normalbereiche für das im Serum gemessene HE4 Protein zu definieren. Dabei stellte sich als ein entscheidender Faktor das Alter dar: im Vergleich zu 20jährigen Probanden fielen die HE4 Werte bei 30jährigen 2%, bei 40jährigen 9%, bei 50jährigen 20%, bei 60jährigen 37%, bei 70jährigen 63% und bei 80jährigen um 101% höher aus. Ferner hatten Raucher 29% höhere HE4 Werte im Vergleich zu Nichtrauchern [121]. Die Korrelation des HE4 Proteins mit dem Alter der Patienten aus unserem Kollektiv der Palliativpatienten bei schrittweiser Regressionsanalyse, decken sich mit den Ergebnissen der norwegischen Forscher. Ebenfalls konnten Yamashita et al. und Bandiera et al. signifikante Korrelationen zwischen Serum HE4 Werten und zunehmendem Alter feststellen [122, 123]. Ein weiteres großes Patientenkollektiv von insgesamt 1101 gesunden und 67 schwangeren Frauen wurden von Moore et al. mit der selbigen Intention wie die der norwegischen Forschergruppe, der Etablierung von Normalbereichen von HE4 im Serum, untersucht. Auch ihre Ergebnisse decken sich mit den unseren: HE4 Werte variieren signifikant mit steigendem Alter und daher postulieren Moore et al., dass dies beim Festlegen insbesondere der oberen Grenze von Normalbereichen berücksichtigt werden muss. Interessant waren die Ergebnisse der schwangeren Frauen: Sie hatten signifikant niedrigere HE4 Werte [124]. Das HE4 Werte signifikant bei ein und derselben gesunden Frau fluktuieren können, zeigten Anastasi und Mitarbeiter. Die Gruppe berichtete übersignifikant unterschiedliche HE4 Werte, je nachdem in welcher Phase des Menstruationszyklus sie sich befanden. Dies war allerdings nur bei Frauen jünger als 35 Jahre der Fall [125].

Mokhtar et al. untersuchten ein asiatisches Kollektiv aus Malaysia von je 150 prä- und 150 postmenopausalen Frauen im Alter zwischen 20 und 76 Jahren, um die diagnostischen Fähigkeiten des HE4 Proteins in frühen Stadien bei Ovarialkarzinomen zu untersuchen. Auch sie stellten eine Erhöhung des HE4 Wertes vor allem bei Frauen älter als 50 Jahren fest und konnten zusätzlich signifikante Unterschiede zwischen den Ethnien ermitteln: die indischen Frauen zeigen signifikant höhere HE4 Werte im Vergleich zu den malaysischen Frauen, währenddessen keine Unterschiede zu den Chinesinnen zu verzeichnen waren. Hieraus schließt die Forschergruppe, dass im Hinblick auf Referenzwerte auch die Ethnien einbezogen werden müssen und ev. die genetische Dispositionen eine mögliche Rolle spielen könnte [126].

Weiterhin konnten wir eine signifikante Korrelation des HE4 Proteins mit der Kreatinin-clearance feststellen. Dass die HE4 Werte bei Patienten mit eingeschränkter

Nierenfunktion signifikant erhöht sind, zeigten auch die Ergebnisse von Nagy et al. aus einer im Juli 2012 veröffentlichten Studie. Dort wurden die HE4 und auch die CA125 Serumkonzentrationen bei 113 weiblichen Patienten mit unterschiedlichen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz und ohne Existenz eines Ovarial- oder Lungenkarzinoms gemessen. Als Kontrollgruppe dienten 68 gesunde Patientinnen mit normaler Nieren- und Ovarialfunktion. Unabhängig vom Alter waren die HE4 als auch die CA125 Serumkonzentrationen signifikant bei den Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion erhöht (<90 mL/min/1,73m² beim HE4 Protein). Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchung von Hertlein et. al.: Zur besseren Interpretation von HE4 Werten im klinischen Alltag untersuchten sie bei 205 gesunden Probanden, 654 Patienten mit benignen Erkrankungen und 720 Patienten mit malignen Erkrankungen die Expression von HE4 im Serum. Hierbei stellten sie die höchsten HE4 Werte bei männlichen und weiblichen Patienten unabhängig welcher Patientengruppe sie angehörten mit Nierenversagen fest [127]. Somit müssen erhöhte HE4 Werte sorgsam in Bezug auf die Nierenfunktion interpretiert werden [127, 128], dazu mehr unter 6.3.2.1.

6.3 Das HE4 Protein als Parameter zur Identifikation von Risikopatienten

6.3.1 HE4 als Prädiktor der Mortalität in der Epididymitis-Gruppe

Um herauszufinden, ob die Patienten nach der Erstdiagnose nochmals erkrankten oder eine chronische Epididymitis entwickelten, verfolgten wir telefonisch die Patienten bis Dezember 2010. Unerwarteter Weise verstarben 10 der 77 Patienten aufgrund verschiedener Ursachen. Die verstorbenen Patienten hatten schon bis zu drei Jahre vor dem Tod erhöhte HE4 Werte. Ähnliches berichten auch Anderson et al., die bei einer Gruppe mit Frauen bis zu drei Jahre vor der Erstdiagnose eines Ovarialkarzinoms eine langsame stetige Steigerung der HE4 Werte beobachten konnten [129]. In unserer Studie berechneten wir bei einem Cut-off-Wert von 77,5 pmol/l des HE4 Serumwertes eine Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 84% zur Vorhersage der Mortalität in den nächsten drei Jahren unbeachtet der unterliegenden Ätiologie. Lagen die Patienten mit ihren HE4-Werten über dem Cut-off-Wert, so hatten diese eine Überlebenschance von 61,5%, währenddessen die Patienten mit HE4-Werten unter dem Cut-off eine Über-

lebenswahrscheinlichkeit von 98,8% aufwiesen. Immer wieder wird in verschiedenen Studien versucht Prädiktoren für Mortalität bzw. Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf verschiedenste Erkrankungen bzw. nach verschiedenen Interventionen zu evaluieren. Hierbei ist gemeinhin akzeptiert, dass Faktoren bzw. Parameter wie zum Beispiel erhöhte Serumkreatininwerte mit dem Tod assoziiert sind bzw. unabhängige signifikante Risikofaktoren darstellen können [130-132]. Interessanterweise präsentierte sich das HE4-Protein in dem Epididymitis-Kollektiv als ein besserer Prädiktor im Vergleich zum Serumkreatinin bezüglich der Mortalität. Weiterhin gibt es klinisch etablierte Rechenmodelle, mit denen versucht wird, für Patientenkollektive Prognosen in Bezug auf Mortalität zu erstellen. Eine dieser Scores ist der „Charlson comorbidity index“. Bereits im Jahre 1987 von Charlson et al. erstellt, versucht dieser Index durch Gewichtung von Schwere und Anzahl der verschiedenen Komorbiditäten eines Patienten, die 1-Jahres Mortalität zu prognostizieren, was sich in einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren als valide herausstellte [133]. Auch wenn im Vergleich zum „Charlson comorbidity index“ nicht alle von uns untersuchten Komorbiditäten mit erhöhten HE4 Werten korrelierten bzw. in die Berechnung der Mortalität eingehen (siehe 6.2), so präsentierte sich das HE4 Protein alleine bereits als starker Prädiktor der Mortalität in der Epididymitis-Gruppe. Um diese mögliche prognostische Vorhersagekraft zu untersuchen, rekrutierten wir ein weiteres Patientenkollektiv von 100 Tumorpatienten, die sich in palliativer Behandlung befanden, mit der Vorstellung, die Vorhersagekraft des HE4 Proteins näher evaluieren zu können.

6.3.2 HE4 als Prädiktor der Mortalität und prognostischer Biomarker in der Palliativgruppe

Obwohl viele Studien über das HE4-Protein bezüglich des Nutzens als diagnostischen Biomarker bzw. Prädiktor für gynäkologische Tumoren publiziert worden sind [89, 117, 134-137], und die Nutzbarkeit als unabhängigen prognostischen Biomarker bezüglich des klinischen Outcomes und der Mortalität bzw. Überlebenswahrscheinlichkeit gezeigt werden konnte [101, 138-147], gibt es aktuell nur wenige Studien außerhalb des gynäkologischen Bereichs, die das HE4-Protein als möglichen Prädiktor der Überlebenswahrscheinlichkeit untersuchen bzw. zeigen, dass erhöhte HE4-Level mit einer signifikant schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen und die prognostischen Eigenschaften des HE4 Proteins herausstellen.

Eine der ersten Arbeiten in der die HE4 Expression in Tumorgewebe in Bezug auf eine 5-Jahres-Überlebensrate untersucht wurde, kam von Kamei et al.. Hier wurden im Zeitraum von 2004 bis 2009 die extirpierten Tumorgewebe von insgesamt 129 operierten Frauen mit Brustkrebs untersucht, die Gewebe auf die HE4 Expression analysiert und auf Korrelationen mit den klinisch pathologischen Faktoren geprüft. Dabei war bei den Patienten mit einem HE4 positiven Tumor die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich erniedrigt gegenüber der Patientengruppe mit HE4 negativem Gewebe (58.6% versus 85.6%, $p=0.04$). Des Weiteren konnte eine deutliche Korrelation mit der Gewebeexpression des HE4 Proteins und Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Daraus schlossen sie, dass die HE4 Expression ein möglicher prädiktiver Faktor sein kann [148]. Yamashita et al. nahmen sich dieser Fragestellung ebenfalls an und konnten in ihrer Studie bei 137 mit an Adenokarzinom der Lunge erkrankten Patienten feststellen, dass die HE4-Expression in diesem Kollektiv ein guter prognostischer Faktor für die 5 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit ist (HE4 positives Serum 44.6% versus HE4 negatives Serum 82.3%, $p=0.001$) [149]. Ähnlich der Ergebnisse von Kamei et al. bei Brustkrebs-Patientinnen und von Yamashita bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge konnten wir zeigen, dass die Palliativpatienten dieser Studie mit höheren HE4 Werten ($>77,5$ pmol/l bzw. > 75 pmol/l/Serumkreatinin) auch eine signifikant höhere Sterbewahrscheinlichkeit hatten, obwohl es ein gemischtes Kollektiv bezüglich der Tumorentitäten war.

Wir konnten in unseren Serum-Analysen bezüglich HE4 und verschiedener Metastasen, bzw. Prädilektionsorten keine Korrelation oder Signifikanz feststellen. Hierbei untersuchten wir die Beziehungen zwischen verschiedenen Tumorerkrankungen und der Expression von HE4 Protein im Serum. Mittlerweile gibt es einige Arbeiten zu der Expression von HE4 in verschiedenen Geweben bzw. Tumoren/Karzinomen, in denen gezeigt werden konnte, welche Gewebe mehr, weniger oder gar kein HE4 Protein exprimieren bzw. sich deutlich mittels der HE4 Gewebeexpression unterscheiden lassen [81, 82]. Im Gegensatz dazu konnten wir keine signifikanten Unterschiede der Serumkonzentrationen des HE4 im Vergleich der verschiedenen Tumorentitäten feststellen.

Die signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit erhöhten Serum HE4 Werten beschrieben auch Bignotti et al. in einer im April 2011 publizierten Studie. Sie untersuchten bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom die Korrelationen von hohen HE4 Serumwerten mit den klinisch-pathologischen Faktoren sowie die Überlebensraten. Dabei zeigte das HE4 Protein zudem hohes Tumormarkerpotential: Hohe

HE4 Serumwerte korrelierten mit aggressiven Phänotypen des Endometriumkarzinoms einhergehend mit den Folgen verminderter Überlebenszeit, so dass sie ebenfalls eine Eignung des HE4 Proteins als unabhängigen prognostischen Biomarker vermuten [103]. Im Vergleich der Ergebnisse von Bignotti mit unserer Studie, war das erhöhte Serum HE4 Protein ebenfalls ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Überleben in unserem Untersuchungszeitraum.

In einer weiteren Studie, veröffentlicht im Dezember 2012, unterstreichen Yamashita et al. erneut das Potential des HE4 Proteins als Biomarker; nicht nur zur Prognose bezüglich der 5 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit, sondern ebenso zur Diagnose bzw. Tumor- Detektion nach erfolgter Intervention: Ein postoperativer Anstieg der HE4 Werte zeigte eine signifikante Korrelation mit einem Rezidiv des Adenokarzinoms der Lunge. Weiterhin konnten sie eine signifikante Korrelation von HE4 Werten mit dem Alter, befallenen Lymphknotenstatus und karzinogenem Antigen zeigen. Sie postulieren daher die Assoziation von steigenden HE4 Werten und dem Fortschreiten des pulmonalen Karzinoms [123]. Iwahori et al. untersuchten Patienten mit Lungenkarzinomen (klein- und nicht kleinzellige Adenokarzinome) als auch Patienten mit Ovarialkarzinomen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe in Bezug auf die diagnostischen und prognostischen Fähigkeiten des HE4-Proteins. Hierbei zeigten sich signifikant höhere HE4-Werte der Karzinompatienten im Gegensatz zu der gesunden Kontrollgruppe. Weiterhin berechnete Iwahori die AUC mit 0,988 (Sensitivität: 89,8%; Spezifität=100%) für die diagnostischen Unterscheidung mittels HE4 im Serum (Cut-off-Wert von 6,56 ng/ml) zwischen den Lungenkarzinompatienten und der gesunden Kontrollgruppe. Dies ist bislang auch die einzige Studie bezogen auf nicht gynäkologische Tumore, welche die HE4 Proteinexpression im Hinblick auf Therapieansprechen nach Applikation einer Chemotherapie untersucht. So korrelierten hohe HE4 Level nach der Applikation einer Chemotherapie (>15 ng/ml) signifikant mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge. Aus diesen Ergebnissen schlossen Iwahori et al. ähnlich zu Yamashita et al., das mögliche Potential des HE4 Proteins als diagnostischen und prognostischen Marker und letzten Endes auch als Verlaufsparemeter des Therapieansprechens einer Chemotherapie sowie möglichen „Rezidivmarker“ bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge [150]. Die Frage, ob das HE4 Protein tatsächlich als ein Marker für die Detektion eines Tumorrezidivs benutzt werden kann, stellten sich Plotti et al.: Sie untersuchten die Seren von 34 Patientinnen 24 Stunden vor operativer Intervention, bei denen der Verdacht auf ein Rezidiv eines malignen Ovarial-

tumors bestand, verglichen mit einer ebenso großen Kontrollgruppe mit benignen Adnex Tumoren. Dabei war das HE4 Protein dem CA125 in der Vorhersagekraft überlegen und in Kombination konnten beide ein Rezidiv mit einer Sensitivität von 76,47% und Spezifität von 100% vorhersagen [118]. Ähnliches zeigten die Ergebnisse von Schummer et al. beim Vergleich von mehreren klinisch noch nicht etablierten Biomarkern und dem bereits klinisch genutzten Marker CA125 zum Monitoring von Ovarialkarzinomen. Auch Sie kamen zu dem Schluss, dass das HE4 Protein im Gegensatz zum CA125 bei Ovarialkarzinomen nach chirurgischer Intervention und chemotherapeutischer Behandlung ein Rezidiv früher detektieren kann und ein fehlendes Absinken nach erfolgter Behandlung ein schlechter prognostischer Faktor sein könnte. Mehr noch: bei Patientinnen, die keine CA125 Expression zeigen, könnte das HE4 Protein helfen klinische Entscheidungen zu treffen [151].

6.3.2.1 Berücksichtigung der Nierenfunktion bei Festlegung des HE4 Cut-Offs

Mit unseren Untersuchungen konnten wir also in beiden Patientenkollektiven die Fähigkeiten des Serum-HE4 Proteins als prognostischen Biomarker herausstellen, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem Serumwert über 77,5 pmol/l bzw. 75 pmol/l signifikant geringer ist, als für die Patienten mit einem kleineren HE4 Wert unter diesem Cut-off. Der spezifischere Cut-off Wert von 75 pmol/l ergab sich bei der Berücksichtigung der Kreatinin Werte auf die HE4 Serumkonzentrationen. Es stellt sich hier also die Frage der Verstoffwechslung des HE4 Proteins (vgl. 6.2). Wir konnten eine signifikante Beziehung zwischen der Nierenfunktion und dem HE4 Protein zeigen und rechtfertigen damit auch die Berechnungen der HE4 modifizierten Werte in Bezug auf die Kreatinin Werte [152]. Ähnlich zu unseren Berechnungen der HE4 Konzentration mit Berücksichtigung der Nierenfunktion, konnten auch Macuks et al. eine höhere diagnostische Genauigkeit erreichen, indem sie die HE4 Werte in Verhältnis mit der glomerulären Filtrationsrate setzten. Sie untersuchten die Serum- und Urin HE4 Werte bei 23 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, 37 Patientinnen mit benignen Ovarialtumoren und 18 gesunden Frauen in der Kontrollgruppe zur Frage der differentialdiagnostischen Genauigkeit zur Unterscheidung der drei Kollektive. Auch wenn das Urin HE4 bezüglich der diagnostischen Unterscheidung zwischen benignen und malignen Ovarialtumoren vergleichbar mit dem Serum HE4 war, blieb das Serum HE4 dem Urin HE4 überlegen [100].

6.4 Einordnung des HE4 Proteins in die klinische Praxis und jüngste Erkenntnisse

Nachdem es mittlerweile einige Studien bezüglich der Gewebeexpression von HE4 gibt [81, 148, 149], und bisher nur wenige bezüglich der Serumexpression bei Tumorerkrankungen [86, 103, 153], wäre es sinnvoll die Chancen des HE4 Proteins zur Nutzung als einen möglichen Tumorbiomarker auch außerhalb des gynäkologischen Bereichs weiterhin zu untersuchen und unter Umständen weiter zu entwickeln. In dem Bereich der onkologischen Gynäkologie hat das HE4 Protein in der letzten Zeit eine hohe Wertigkeit als Biomarker erfahren. So fand im November 2011 ein Expertentreffen mit Spezialisten aus 16 europäischen Ländern statt, bei dem die analytischen und klinischen Fähigkeiten des HE4 Proteins diskutiert wurden. Dabei wurden insbesondere die vorhandenen Daten und Evidenzen der Risikostratifizierung, Diagnose, Prognose und Monitoring bei gynäkologischen Tumorerkrankungen mittels HE4 Protein zusammengefasst und Empfehlungen für notwendige weitere Studien ausgesprochen [154]. Schließlich wurde im Jahre 2011 das HE4 Protein von der „US Food and Drug Administration“ (FDA) in Verbindung mit dem bereits in der Klinik verankerten Tumormarker CA125 zur Rezidiv- und Verlaufskontrolle des Ovarialkarzinoms zugelassen (siehe 6.1 und 6.3.2) [118].

Vor allem im gynäkologischen Bereich, gibt es Bemühungen neue weitere Erkenntnisse über das HE4 Protein zu gewinnen und um den klinischen Nutzen voran zu treiben, wie z. B. Moore et al., die das HE4 Protein als möglichen Stagingmarker in Bezug auf die Infiltrationstiefe beim Endometriumkarzinom vermuten und der daraus folgenden präoperativen Planung bezüglich Lymphknotenresektionen Entscheidungshilfe geben könnte [155].

Studien in Bezug auf die Fähigkeiten oder mögliche Rollen des HE4 Proteins gehen in verschiedenste Richtungen. So postulieren in einer Studie Gao et al. eine mögliche Bedeutung des HE4 Proteins in der Karziogenese bei Ovarialkarzinomen. Mittels Transfektion wurden exogene HE4 Gene in Ovarialkarzinom- und Ovarialepithel-Zelllinien eingebracht, was zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation führte. In dieser erstmalig durchgeführten Studie konnten die Autoren also eine funktionale Wichtigkeit des HE4 Proteins in zellulären Regulationsprozessen und womöglich einen protektiven Effekt als Inhibitor der Zellproliferation bei Ovarialkarzinomen dokumentieren [156]. Dem entgegengesetzt, allerdings beim Endometriumkarzinom, schreiben

die Forscher Li et al. im März 2013 dem HE4 Protein eine zentrale Bedeutung in gegenteiliger Richtung zu: Sie denken, dass eine Überexpression direkten Effekt auf die Progression des Tumors hat [157]. Dass das HE4 Protein im Zellzyklus involviert ist, zeigten ebenfalls Zou et al.: Mittels „Gen-Silencing“ in HE4 überexprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien konnten sie deutliche Veränderungen beobachten. So inhibierte das Ausschalten des HE4 Gens die Zellproliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen in vitro und somit könnte das HE4 Protein den Zellzyklus verändern und Tumorwachstum fördern [158]. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen die Forscher um Lu et al. und gehen sogar soweit, dass dem HE4 Protein in Zukunft möglicherweise eine Rolle in der Genbasierten Therapie zu Gute kommen könnte [159]. Aber auch in der Grundversorgung als denkbarer Screening Marker und Monitoring für Tumore des Ovars könnte das HE4 Protein eingesetzt werden [160].

Außerhalb des gynäkologischen als auch onkologischen Bereiches sehen LeBleu et al. das HE4 Protein als möglichen Biomarker der Nierenfibrose und in Zukunft denkbares therapeutisches Target [161].

Die Erkenntnisse um das HE4 Protein haben sich seit der Entdeckung im Jahre 1991 schnell entwickelt und finden zunehmend Einzug in die klinische Routine als Biomarker. In relativ kurzem Zeitraum gelang es dem Protein einen festen Stellenwert in vielen Bereichen der Medizin zu erlangen und HE4 wird in Zukunft sicher noch eine stärkere Bedeutung als Biomarker in der Diagnostik und Therapieentscheidung bekommen.

7. Zusammenfassungen

7.1 Zusammenfassung

Einleitung

Die Epididymitis ist eine häufige urogenitale Infektion. Diese Erkrankung des Nebenhodens macht ungefähr 0,3% aller Fälle der ambulanten ärztlichen Konsultationen für Männer im Alter zwischen 18 und 50 Jahren aus. Da es in bis zu 60% der Fälle zu einem Übergreifen der Entzündung auf den Hoden kommt, spricht man häufig auch von einer Epididymoorchitis. Die Diagnose der akuten Epididymitis stützt sich auf die klinische Untersuchung und Anamnese, wobei besonders die Abgrenzung bzw. der Ausschluss von Differentialdiagnosen zum akuten Skrotum, insbesondere der Hodentorsion, im Vordergrund stehen. Bislang gibt es keine Epididymitis-spezifischen Marker, die den Entscheidungsprozess der Diagnosestellung erleichtern könnten. Als ein möglicher Biomarker wird das Humane Epididymitis Protein 4 (HE4) diskutiert und soll in dieser Arbeit bezüglich dieser Fragestellung evaluiert werden. Die ersten Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhten HE4 Werten und einer verlängerten Hospitalisierungsdauer sowie einer erhöhten Mortalität auf. Daher stellte sich die Frage einer möglichen Eignung des HE4 Protein als Identifikator für Risikopatienten. Diese wurde dann mit einem weiteren Patientenkollektiv, bestehend aus weiblichen und männlichen palliativ behandelten Tumorpatienten, bearbeitet.

Material und Methoden

Zur Evaluation des HE4 Proteins als möglichen Biomarker der akuten Epididymitis wurden bei insgesamt 77 Patienten mit akuter Epididymitis die HE4 Werte aus dem Serum am Aufnahmetag zusätzlich zum Routinelabor bestimmt, wobei bei 39 dieser Patienten nochmals bei Wiedervorstellung an den Tagen 18 und 84 der HE4 Wert gemessen wurde. Zusätzlich wurden bei weiteren 20 Patienten mit Urolithiasis und 16 Patienten mit Testalgie die HE4 Serumwerte am Aufnahmetag als Kontrollgruppen bestimmt. Alle HE4 Werte wurden mittels ELISA-Assay quantifiziert. Um mögliche Assoziationen zu erhöhten HE4 Werten bei dieser Studiengruppe zu ermitteln, wurden Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten, Fieber), mögliche Komorbiditäten und der funktionale Selbstständigkeitsindex (FIM-Sore) erfasst.

Da die Auswertungen eine signifikante Assoziation von hohen HE4 Werten und erhöhter Mortalität ergaben, stellte sich die Frage einer möglichen Brauchbarkeit des HE4 Proteins zur Identifizierung von Risikopatienten. Dazu wurden einmalig HE4 Serumproben von weiteren 100 Palliativ-Patienten untersucht, sowie alle klinischen (Tumorentität, mögliche Metastasen etc.) und laborchemischen Daten, als auch Komorbiditäten der Patienten auf mögliche Assoziationen mit erhöhten HE4 Werten hin evaluiert. Diese Studiengruppe bestand aus männlichen und weiblichen Patienten, die allesamt an einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung litten und über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten prospektiv weiterverfolgt wurden, um die Assoziation zwischen erhöhten HE4 Werten und erhöhter Mortalität genauer zu prüfen. Auch hier wurden alle HE4 Werte mittels ELISA-Assay quantifiziert.

Ergebnisse

Erhöhte HE4 Level haben keine Assoziation zur akuten Epididymitis und anderen Entzündungsparametern wie Fieber ($p=0,886$; $r=-0,017$), CRP ($p=0,007$; $r=0,304$) und Leukozyten ($p=0,543$; $r=0,105$). Ebenso änderten sich bei den 39 Patienten bei Erstvorstellung mit Epididymitis und nach Behandlung die HE4 Werte an den Kontrolluntersuchungen nach 18 und 84 Tagen nicht ($p=0,8$). Allerdings stellte sich heraus, dass die Komorbiditäten, aufgeteilt in 7 Unterkategorien, und erniedrigte FIM-Scores mit erhöhten HE4-Werten assoziiert waren ($p<0,01$). Weiterhin war die Hospitalisierung der Patienten bei erhöhten HE4-Werten signifikant verlängert und die Mortalität erhöht ($p<0,001$).

In dem Patienten-Kollektiv mit fortgeschrittenen Tumoren zeigte sich, dass Patienten mit hohen HE4 Werten unabhängig von der Grunderkrankung eine signifikante Erhöhung der Mortalität aufwiesen ($p<0,05$). In der Regressionsanalyse waren zunehmendes Patientenalter ($p<0,01$) und eine reduzierte Kreatininclearance ($p<0,001$) der Patienten unabhängige Prädiktoren für erhöhte HE4 Werte. Keinen Unterschied der HE4-Werte gab es zwischen den in 6 Unterkategorien eingeteilten Tumorerkrankungen ($p=0,647$). Des Weiteren konnten wir zeigen, dass keiner der neun verschiedenen Metastasierungs- bzw. Prädilektionsorte einen Effekt auf den HE4-Wert hatte (stets $p>0,05$).

Diskussion

Das HE4 Protein ist nicht als Biomarker der akuten Epididymitis geeignet, noch ist es als zusätzlicher laborchemischer Wert neben den aktuell zur Diagnosestellung der akuten Epididymitis benutzten klinischen und laborchemischen Parametern als Diagnose- und/oder Verlaufskriterium sinnvoll zu nutzen.

In dem Kollektiv der Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zeigten Patienten mit erhöhten HE4-Werten eine signifikant erhöhte Mortalität, so dass das HE4-Protein unserer Studie folglich als Identifikator für Risikopatienten hätte eingesetzt werden können, wobei der genaue Mechanismus bezüglich der Gewebe- und Serumexpression und Elimination sowie die eigentliche Funktion des Proteins unbekannt bleibt und Raum für folgende Forschungsvorhaben lässt.

7.2 Summary

Introduction

Epididymitis is a common urological disease. About 0.3% off all outpatient consultations are caused by acute Epididymitis for men between the age of 18 – 50 years. Often, in up to 58% of all cases, the infection spreads from the epididymis into the testicles and the patients have concomitant involvement of the testis. Therefore, this condition is also called epididymo-orchitis. Currently, the diagnosis is based on the clinical findings and the medical history. Unfortunately, there is no epididymitis specific marker yet to support the diagnostic decision-making process and to distinguish between time limited other acute scrotum conditions like testicular torsion. The human epididymis Protein 4 (HE4) has been described originally as an epididymis-specific marker. Therefore, this thesis evaluates the potential use of HE4 as a biomarker for acute epididymitis. By reviewing the first results indicating HE4 to be associated with various comorbidities and mortality, the question arose, if HE4 can identify patients at a higher risk. Therefore, a palliative care study group, consisting of female and male tumor patients, was enrolled.

Material and Methods

This study evaluates the HE4 Protein as a potential biomarker for acute epididymitis. Therefore, we examined 77 patients with acute epididymitis and determined the serum HE4 levels in addition to the normal blood analysis at their admission day. For 39 of

these 77 patients we performed additional HE4 tests on two follow up days (days 18 and 84). As control group we investigated 20 patients with urolithiasis and 16 patients with testalgia, where HE4 testing was also performed on admission day. All HE4 levels were determined with ELISA-Assay. To determine possible associations of high HE4 levels, we recorded infection parameters (C-reactive protein, white blood count, fever), comorbidities and the patients functional index (FIM-score).

Since the results showed a significant association between high HE4 levels and an increased mortality, we designed an additional study to evaluate HE4 as a possible biomarker to identify patients at a higher risk. Therefore, we created a new study group out of 100 palliative treated female and male patients with several tumor entities and determined the serum HE4 level once. In addition, we recorded all clinical data (tumor entity, possible metastases etc.) and blood findings as well as comorbidities to find any associations. These patients were prospectively followed and monitored for a minimum of 12 months to investigate the association of increased HE4 level and a higher mortality. Again, all HE4 levels were determined using ELISA-Assay.

Results

Our findings indicated no association of HE4 with acute epididymitis as well as different infection-related parameters such as fever ($p=0,886$; $r=-0,017$), CRP ($p=0,007$; $r=0,304$) and white blood cell count ($p=0,543$; $r=0,105$). Even after successful treatment, cured patients did not show any changes in HE4 level as we could see comparing the blood samples of the 39 patients over time at days 1, 18 or 84 ($p=0,8$). However, the presence of different comorbidities showed an association with HE4 levels and also the FIM-Score resulted in elevated HE4 levels ($p<0,01$). Furthermore, mortality and hospitalisation were significantly increased and prolonged in patients with higher HE4 values ($p<0,001$).

In the palliative treated study group the survival rate was significantly reduced for the population with an HE4 level above the cut-off of 75 pmol/l/creatinine independent of the underlying disease or cause of death ($p<0,05$). Through regression analysis we could show higher age ($p<0,01$) and reduced creatinine clearance ($p<0,001$) to be associated with increased HE4 levels. There was no difference in the serum concentration of HE4 in six different types of malignancies ($p=0,647$). Furthermore, the nine different metastatic manifestations showed no association or impact on HE4 levels (always $p>0,05$).

Discussion

The HE4 protein can neither be used as a biomarker for acute epididymitis nor as a useful addition to the clinical and lab parameters currently used in the daily diagnosing routine and clinical course in the hospitals.

In this study the HE4 protein could have been used for identification of patients being at risk for a shortened survival rate respectively higher mortality although the mechanism of expression and function in different tissues or blood serum remains unknown. Future studies will be necessary to further investigate the biological potential of this interesting marker.

8. Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
AZ	Aktenzeichen
AUC	area under the curve
CA 125	Cancer-Antigen 125
Cal	Kalibrator
CCD	charge-coupled device
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CCr	Kreatinin-Clearance
CRP	c-reaktives Protein
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
E. coli	Escherichia coli
EIA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FDA	US Food and Drug Administration
FIM-Score	Functional Independence Measure-Score
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GTDS	Gießener Tumor Dokumentationssystem
h	Stunde
HE4	Humanes Epididymis Protein 4

8. Abkürzungsverzeichnis

HNO	Hals-Nasen-Ohren
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
KAOS-System	klinisches Arbeitsplatzsystems
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
MAb	monoklonaler Antikörper
Mio.	Millionen
min	Minute
mg	Milligramm
μL	Mikroliter
ng	Nano Gramm
Nr.	Nummer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol/l	pico Mol pro Liter
PSA	Prostata spezifisches Antigen
ROC	Receiver Operating Characteristic
r/min	revolutions per minute
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
SCr	Serum-Kreatinin
Spp.	Subspecies

8. Abkürzungsverzeichnis

USA	United States of America
WFDC	whey acidic four-disulfide core protein

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 80 Serumproben für HE4 Testung.....	19
Abbildung 2: Vorbereitete Tracerlösung.....	19
Abbildung 3: Waschen der Wells mit 8-fach Pipette.....	20
Abbildung 4: Inkubation mit Tracerlösung.....	21
Abbildung 5: Letzte Inkubation unter Ausschluss von Sonnenlicht.....	21
Abbildung 6: Spektrophotometer zur Absorptionsmessung.....	21
Abbildung 7: Farbumschläge verschiedener Intensität.....	22
Abbildung 8: Kreatinin-Clearance nach Cockroft und Gault.....	22
Abbildung 9: Demographie der 77 Epididymitis-Patienten der vorliegenden Arbeit.....	25
Abbildung 10: Antibiotische Vorbehandlung bei 26 Patienten nach verschiedenen Antibiotikaklassen.....	26
Abbildung 11: Illustration der Keimnachweise bei 77 Patienten mit akuter Epididymitis in Abhängigkeit der antibiotischen Vorbehandlung.....	26
Abbildung 12: Bakteriologisches Keimspektrum bei unbehandelten und antibiotisch vortherapierten Patienten.....	28
Abbildung 13: Normalisierung der Leukozyten im Blut bei 50 Patienten mit initialer akuter Epididymitis im Zeitverlauf.....	29
Abbildung 14: Gepaarte CRP-Werte bei 49 Patienten im Zeitverlauf.....	30
Abbildung 15: Signifikante Abnahme des PSA-Wertes bei 48 Patienten im Zeitverlauf von Visite zu Visite.....	31
Abbildung 16: Altersverteilung bei der Testalgie – Kontrollgruppe.....	32
Abbildung 17: Altersverteilung bei der Urolithiasis – Kontrollgruppe.....	32
Abbildung 18: HE4-Werte in logarithmischer Darstellung bei den Gruppen der Patienten mit Epididymitis im Vergleich mit den Gruppen der Patienten mit Testalgie und Urolithiasis.....	33
Abbildung 19: HE4-Werte in logarithmischer Darstellung bei Epididymitis-Patienten ohne Komorbiditäten im Vergleich mit den Patienten mit Testalgie und Urolithiasis.....	34
Abbildung 20: HE4 Serumwerte der 39 Patienten mit akuter Epididymitis an Tag 1 und nach erfolgreicher Therapie an den Tagen 14 und 84.....	36
Abbildung 21: Logarithmische Darstellung der HE4 Werte in Bezug auf das Serum-Kreatinin bei 113 untersuchten männlichen Patienten.....	38
Abbildung 22: HE4 Werte in logarithmischer Darstellung bei 113 untersuchten	

männlichen Patienten in Bezug auf die Kreatinin-Clearance errechnet entsprechend der Cockcroft-Gault-Formel.....	39
Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der HE4 Werte bezogen auf das Serumkreatinin bei 39 Patienten mit Epididymitis im Therapieverlauf.....	40
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Assoziation zwischen HE4 Werten in logarithmischer Darstellung und der Gesamtzahl an Komorbiditäten.	40
Abbildung 25: Box-Whisker-Plot zeigt die hochsignifikanten Unterschiede der HE4 Werte der lebenden Patienten und der im Follow-up verstorbenen Patienten.	41
Abbildung 26: Die „area under the curve“ (AUC) identifizierte das HE4 Protein als guten Marker zur Vorhersage „Tod“.....	42
Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit erhöhtem HE4 Werten und „normalen“ Werten.....	43
Abbildung 28: Darstellung der ROC Kurve für HE4 pro Serumkreatinin hinsichtlich der Vorhersage des Todesereignisses. Zu beachten ist die AUC von 0,917.....	44
Abbildung 29: Anzahl der sechs verschiedenen Tumorentitäten.....	45
Abbildung 30: Altersverteilung der 100 Palliativpatienten.	46
Abbildung 31: HE4 Werte in den verschiedenen Tumorentitäten ohne signifikanten Unterschied.....	47
Abbildung 32: Logarithmische Darstellung der HE4-Werte in Bezug auf die Kreatinin-Clearance im Palliativ-Kollektiv von 100 Patienten.	48
Abbildung 33 zeigt die neun Metastasierungsorte in abfallender Reihenfolge.	49
Abbildung 34: Graphische Darstellung der verstorbenen und noch lebenden Patienten anhand der 2 in der Epididymitisgruppe ermittelten HE4 Cut-off-Werte.....	51

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CDC Guidelines 2010 zur Behandlung der akuten Epididymitis.....	7
Tabelle 2: EAU Guidelines 2013 zur Behandlung der akuten Epididymitis und Orchitis	7
Tabelle 3: Übersicht über die Anordnung der Kalibratoren auf der Wellplatte.....	20
Tabelle 4: Auflistung der klinischen Patientendaten.....	23
Tabelle 5: Klinische Parameter bei 77 Patienten mit akuter Epididymitis.....	26
Tabelle 6: Demographische Daten der Patienten und Kontrollgruppen ohne weitere Komorbiditäten (Mediane).....	34
Tabelle 7: Korrelation typischer klinischer Infektionsparameter und HE4 bei Erstvorstellung der Patienten.....	35
Tabelle 8: Einfluss von verschiedenen Erkrankungen und dem Patientenalter auf den HE4-Wert bei 113 Patienten.....	37
Tabelle 9: Darstellung des Überlebens und der Cut-off-Werte.....	42
Tabelle 10: Darstellung des Überlebens anhand des Cut-off Wertes für HE4 pro Serumkreatinin.	44
Tabelle 11: Beschreibung der Patientenkollektive.....	45
Tabelle 12: Verschiedene Parameter der Palliativgruppe.	47
Tabelle 13 zeigt die verschiedenen Komorbiditäten in Beziehung zu HE4 in der univariaten und multivariaten Analyse.....	50

11. Literaturverzeichnis

1. Trojian, T.H., T.S. Lishnak, and D. Heiman, *Epididymitis and orchitis: an overview*. Am Fam Physician, 2009. 79(7): p. 583-7.
2. Nickel, J.C., *Chronic epididymitis: a practical approach to understanding and managing a difficult urologic enigma*. Rev Urol, 2003. 5(4): p. 209-15.
3. Davis, B.E., et al., *Analysis and management of chronic testicular pain*. J Urol, 1990. 143(5): p. 936-9.
4. Lee, J.C., S. Bhatt, and V.S. Dogra, *Imaging of the epididymis*. Ultrasound Q, 2008. 24(1): p. 3-16.
5. Woodwell, D.A. and D.K. Cherry, *National Ambulatory Medical Care Survey: 2002 summary*. Adv Data, 2004(346): p. 1-44.
6. Berger, R.E., et al., *Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases*. J Urol, 1979. 121(6): p. 750-4.
7. Bohm, M.K., T.L. Gift, and G. Tao, *Patterns of single and multiple claims of epididymitis among young privately-insured males in the United States, 2001 to 2004*. Sex Transm Dis, 2009. 36(8): p. 490-2.
8. Mitemeyer, B.T., K.W. Lennox, and A.A. Borski, *Epididymitis: a review of 610 cases*. J Urol, 1966. 95(3): p. 390-2.
9. Doble, A., et al., *Acute epididymitis: a microbiological and ultrasonographic study*. Br J Urol, 1989. 63(1): p. 90-4.
10. Bormel, P., *CURRENT CONCEPTS OF THE ETIOLOGY AND TREATMENT OF EPIDIDYMITIS*. Med Bull US Army Eur, 1963. 20: p. 332-4.
11. Wolin, L.H., *On the etiology of epididymitis*. J Urol, 1971. 105(4): p. 531-3.
12. Comarr, A.E., *Vasoresection following epididymitis among patients with spinal cord injury*. Proc Annu Clin Spinal Cord Inj Conf, 1966. 15: p. 47-52.
13. Mirsadraee, S., et al., *Epididymo-orchitis risk factors in traumatic spinal cord injured patients*. Spinal Cord, 2003. 41(9): p. 516-20.
14. Kaver, I., H. Matzkin, and Z.F. Braf, *Epididymo-orchitis: a retrospective study of 121 patients*. J Fam Pract, 1990. 30(5): p. 548-52.
15. Luzzi, G.A. and T.S. O'Brien, *Acute epididymitis*. BJU Int, 2001. 87(8): p. 747-55.
16. Tracy, C.R., W.D. Steers, and R. Costabile, *Diagnosis and management of epididymitis*. Urol Clin North Am, 2008. 35(1): p. 101-8; vii.

17. Manavi, K., et al., *Audit on the management of epididymo-orchitis by the Department of Urology in Edinburgh*. Int J STD AIDS, 2005. 16(5): p. 386-7.
18. Redfern, T.R., et al., *The aetiology and management of acute epididymitis*. Br J Surg, 1984. 71(9): p. 703-5.
19. De Jong, Z., et al., *The frequency of Chlamydia trachomatis in acute epididymitis*. Br J Urol, 1988. 62(1): p. 76-8.
20. Mulcahy, F.M., et al., *Prevalence of chlamydial infection in acute epididymo-orchitis*. Genitourin Med, 1987. 63(1): p. 16-8.
21. Grant, J.B., et al., *The role of Chlamydia trachomatis in epididymitis*. Br J Urol, 1987. 60(4): p. 355-9.
22. Kristensen, J.K. and J.H. Scheibel, *Etiology of acute epididymitis presenting in a venereal disease clinic*. Sex Transm Dis, 1984. 11(1): p. 32-3.
23. Gierup, J., C. von Hedenberg, and A. Osterman, *Acute non-specific epididymitis in boys. A survey based on 48 consecutive cases*. Scand J Urol Nephrol, 1975. 9(1): p. 5-7.
24. Megalli, M., E. Gursel, and J.K. Lattimer, *Reflux of urine into ejaculatory ducts as a cause of recurring epididymitis in children*. J Urol, 1972. 108(6): p. 978-9.
25. Haahr, J., *Malformations of the urinary tract in children with urinary infections*. Acta Paediatr Scand, 1971. 60(6): p. 730.
26. Amar, A.D. and K. Chabra, *Epididymitis in prepuberal boys. Presenting manifestation of vesicoureteral reflux*. JAMA, 1969. 207(13): p. 2397-400.
27. Kiviat, M.D., D. Shurtleff, and J.S. Ansell, *Urinary reflux via the vas deferens: unusual cause of epididymitis in infancy*. J Pediatr, 1972. 80(3): p. 476-9.
28. Williams, C.B., A.S. Litvak, and J.W. McRoberts, *Epididymitis in infancy*. J Urol, 1979. 121(1): p. 125-6.
29. Kiyan, G., et al., *Epididymitis in infants with anorectal malformation*. Eur Urol, 2003. 43(5): p. 576-9.
30. Bullock, K.N. and J.M. Hunt, *The intravenous urogram in acute epididymo-orchitis*. Br J Urol, 1981. 53(1): p. 47-9.
31. Graumann, L.A., H.G. Dietz, and M. Stehr, *Urinalysis in children with epididymitis*. Eur J Pediatr Surg. 20(4): p. 247-9.
32. Koff, S.A., *Altered bladder function and non-specific epididymitis*. J Urol, 1976. 116(5): p. 589-92.
33. Thind, P., T.C. Gerstenberg, and T. Bilde, *Is micturition disorder a pathogenic*

- factor in acute epididymitis? An evaluation of simultaneous bladder pressure and urine flow in men with previous acute epididymitis.* J Urol, 1990. 143(2): p. 323-5.
34. Svend-Hansen, H., P. Nielsen, and N. Pedersen, *The value of routein intravenous urography in acute epididymitis.* Int Urol Nephrol, 1977. 9(3): p. 245-8.
35. Hoppner, W., et al., *Surgical treatment of acute epididymitis and its underlying diseases.* Eur Urol, 1992. 22(3): p. 218-21.
36. Weidner, W., et al., *[Initial therapy of acute unilateral epididymitis using ofloxacin. I. Clinical and microbiological findings].* Urologe A, 1990. 29(5): p. 272-6.
37. Chan, P.T. and P.N. Schlegel, *Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. Part I.* J Androl, 2002. 23(4): p. 453-60.
38. Berger, R.E., D. Kessler, and K.K. Holmes, *Etiology and manifestations of epididymitis in young men: correlations with sexual orientation.* J Infect Dis, 1987. 155(6): p. 1341-3.
39. Weinstock, H., S. Berman, and W. Cates, Jr., *Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000.* Perspect Sex Reprod Health, 2004. 36(1): p. 6-10.
40. Wasserheit, J.N., *Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases.* Sex Transm Dis, 1992. 19(2): p. 61-77.
41. Mateos Colino, A., et al., *[Tuberculous epididymitis caused by Mycobacterium bovis].* Arch Esp Urol, 2003. 56(2): p. 175-8.
42. Liu, H.Y., et al., *Tuberculous epididymitis: a case report and literature review.* Asian J Androl, 2005. 7(3): p. 329-32.
43. Viswaroop, B.S., N. Kekre, and G. Gopalakrishnan, *Isolated tuberculous epididymitis: a review of forty cases.* J Postgrad Med, 2005. 51(2): p. 109-11, discussion 111.
44. Emerson, C., W.W. Dinsmore, and S.P. Quah, *Are we missing mumps epididymo-orchitis?* Int J STD AIDS, 2007. 18(5): p. 341-2.
45. Singh, R., H. Mostafid, and R.G. Hindley, *Measles, mumps and rubella -- the urologist's perspective.* Int J Clin Pract, 2006. 60(3): p. 335-9.
46. Kaklamani, V.G., et al., *Recurrent epididymo-orchitis in patients with Behcet's*

- disease. J Urol, 2000. 163(2): p. 487-9.
47. Cho, Y.H., et al., *Clinical features of patients with Behcet's disease and epididymitis*. J Urol, 2003. 170(4 Pt 1): p. 1231-3.
48. Coulomb, M.A., et al., [*Epididymitis: Unusual presentation of periarteritis nodosa*]. Prog Urol. 20(4): p. 311-3.
49. de Vries, M., et al., *Polyarteritis nodosa presenting as an acute bilateral epididymitis*. Arch Intern Med, 2001. 161(7): p. 1008.
50. Hutcheson, J., C.A. Peters, and D.A. Diamond, *Amiodarone induced epididymitis in children*. J Urol, 1998. 160(2): p. 515-7.
51. Nikolaou, M., et al., *Amiodarone-induced epididymitis: a case report and review of the literature*. Int J Cardiol, 2007. 121(1): p. e15-6.
52. Somekh, E., A. Gorenstein, and F. Serour, *Acute epididymitis in boys: evidence of a post-infectious etiology*. J Urol, 2004. 171(1): p. 391-4; discussion 394.
53. Eley, A., et al., *Detection of Chlamydia trachomatis by the polymerase chain reaction in young patients with acute epididymitis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992. 11(7): p. 620-3.
54. Kass, E.J. and B. Lundak, *The acute scrotum*. Pediatr Clin North Am, 1997. 44(5): p. 1251-66.
55. Munden, M.M. and L.M. Trautwein, *Scrotal pathology in pediatrics with sonographic imaging*. Curr Probl Diagn Radiol, 2000. 29(6): p. 185-205.
56. Yagil, Y., et al., *Role of Doppler ultrasonography in the triage of acute scrotum in the emergency department*. J Ultrasound Med. 29(1): p. 11-21.
57. Mushtaq, I., M. Fung, and M.J. Glasson, *Retrospective review of paediatric patients with acute scrotum*. ANZ J Surg, 2003. 73(1-2): p. 55-8.
58. Klin, B., et al., *Epididymitis in childhood: a clinical retrospective study over 5 years*. Isr Med Assoc J, 2001. 3(11): p. 833-5.
59. Shapiro, S.R. and L.C. Breschi, *Acute epididymitis in Vietnam: review of 52 cases*. Mil Med, 1973. 138(10): p. 643-5.
60. Workowski, K.A. and S.M. Berman, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006*. MMWR Recomm Rep, 2006. 55(RR-11): p. 1-94.
61. Weidner, W., H.G. Schiefer, and C. Garbe, *Acute nongonococcal epididymitis. Aetiological and therapeutic aspects*. Drugs, 1987. 34 Suppl 1: p. 111-7.
62. Robinson, A.J., et al., *Acute epididymitis: why patient and consort must be investigated*. Br J Urol, 1990. 66(6): p. 642-5.

63. Doehn, C., et al., *Value of acute-phase proteins in the differential diagnosis of acute scrotum*. Eur Urol, 2001. 39(2): p. 215-21.
64. Asgari, S.A., et al., *Diagnostic accuracy of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in patients with acute scrotum*. Urol J, 2006. 3(2): p. 104-8.
65. Strohmeyer, T. and M. Hartmann, *[Diagnosis and therapy of epididymitis]*. Fortschr Med, 1984. 102(9): p. 211-4.
66. Kojima, H., et al., *Local antibody in semen for rapid diagnosis of Chlamydia trachomatis epididymitis*. J Urol, 1988. 140(3): p. 528-31.
67. Workowski, K.A. and S. Berman, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010*. MMWR Recomm Rep. 59(RR-12): p. 67-69.
68. M. Grabe (chairman), T.E. Bjerklund-Johansen, H. Botto, M. Çek, K.G. Naber, R.S. Pickard, P. Tenke, F. Wagenlehner, B. Wullt, *Guidelines on Urological Infections*. 2013: p. 71 - 73.
69. Holmes, K.K., R.E. Berger, and E.R. Alexander, *Acute epididymitis: etiology and therapy*. Arch Androl, 1979. 3(4): p. 309-16.
70. Krieger, J.N., *Epididymitis, orchitis, and related conditions*. Sex Transm Dis, 1984. 11(3): p. 173-81.
71. Witherington, R. and Harper, W.M. 4th., *The surgical management of acute bacterial epididymitis with emphasis on epididymotomy*. J Urol, 1982. 128(4): p. 722-5.
72. Desai, K.M., J.C. Gingell, and J.M. Haworth, *Fate of the testis following epididymitis: a clinical and ultrasound study*. J R Soc Med, 1986. 79(9): p. 515-9.
73. See, W.A., L.A. Mack, and J.N. Krieger, *Scrotal ultrasonography: a predictor of complicated epididymitis requiring orchiectomy*. J Urol, 1988. 139(1): p. 55-6.
74. Kirchhoff, C., et al., *A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors*. Biol Reprod, 1991. 45(2): p. 350-7.
75. Kirchhoff, C., *Molecular characterization of epididymal proteins*. Rev Reprod, 1998. 3(2): p. 86-95.
76. Legare, C., N. Verville, and R. Sullivan, *Vasectomy influences expression of HE1 but not HE2 and HE5 genes in human epididymis*. J Androl, 2004. 25(1): p. 30-43.

77. Kirchhoff, C., et al., *Function of human epididymal proteins in sperm maturation*. *Andrologia*, 1998. 30(4-5): p. 225-32.
78. Bouchard, D., et al., *Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer*. *Lancet Oncol*, 2006. 7(2): p. 167-74.
79. Bingle, L., V. Singleton, and C.D. Bingle, *The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms*. *Oncogene*, 2002. 21(17): p. 2768-73.
80. Clauss, A., H. Lilja, and A. Lundwall, *A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein*. *Biochem J*, 2002. 368(Pt 1): p. 233-42.
81. Galgano, M.T., G.M. Hampton, and H.F. Frierson, Jr., *Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues*. *Mod Pathol*, 2006. 19(6): p. 847-53.
82. Kobel, M., et al., *Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies*. *PLoS Med*, 2008. 5(12): p. e232.
83. Schummer, M., et al., *Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas*. *Gene*, 1999. 238(2): p. 375-85.
84. Hough, C.D., et al., *Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2000. 60(22): p. 6281-7.
85. Drapkin, R., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas*. *Cancer Res*, 2005. 65(6): p. 2162-9.
86. Huhtinen, K., et al., *Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts*. *Br J Cancer*, 2009. 100(8): p. 1315-9.
87. Gilks, C.B., et al., *Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling*. *Gynecol Oncol*, 2005. 96(3): p. 684-94.
88. Montagnana, M., et al., *The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass*. *J Clin Lab Anal*, 2009. 23(5): p. 331-5.
89. Hellstrom, I., et al., *The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma*. *Cancer Res*, 2003. 63(13): p. 3695-700.
90. Bray, F., et al., *Ovarian cancer in Europe: Cross-sectional trends in incidence*

- and mortality in 28 countries, 1953-2000. Int J Cancer, 2005. 113(6): p. 977-90.*
91. *ACOG Practice Bulletin. Management of adnexal masses. Obstet Gynecol, 2007. 110(1): p. 201-14.*
 92. Moore, R.G., et al., *The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. Gynecol Oncol, 2008. 108(2): p. 402-8.*
 93. Hellstrom, I. and K.E. Hellstrom, *Two novel biomarkers, mesothelin and HE4, for diagnosis of ovarian carcinoma. Expert Opin Med Diagn. 5(3): p. 227-240.*
 94. Moore, R.G., et al., *Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. Obstet Gynecol. 118(2 Pt 1): p. 280-8.*
 95. Rein, B.J., et al., *Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer. J Oncol. 2011: p. 475983.*
 96. Chang, X., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. Int J Gynecol Cancer. 21(5): p. 852-8.*
 97. Kim, Y.M., et al., *Evaluation of the accuracy of serum human epididymis protein 4 in combination with CA125 for detecting ovarian cancer: a prospective case-control study in a Korean population. Clin Chem Lab Med. 49(3): p. 527-34.*
 98. Lin, J., J. Qin, and V. Sangvatanakul, *Human epididymis protein 4 for differential diagnosis between benign gynecologic disease and ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, (0).*
 99. Hellstrom, I., et al., *Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms. Cancer Lett. 296(1): p. 43-8.*
 100. Macuks, R., I. Baidekalna, and S. Donina, *Urinary concentrations of human epididymis secretory protein 4 (he4) in the diagnosis of ovarian cancer: a case-control study. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. 13(9): p. 4695-8.*
 101. Steffensen, K.D., et al., *Prognostic Impact of Prechemotherapy Serum Levels of HER2, CA125, and HE4 in Ovarian Cancer Patients. Int J Gynecol Cancer. 21(6): p. 1040-7.*
 102. Paek, J., et al., *Prognostic significance of human epididymis protein 4 in epithelial ovarian cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 158(2): p. 338-42.*

103. Bignotti, E., et al., *Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients*. Br J Cancer. 104(9): p. 1418-25.
104. Yamashita, S., et al., *Prognostic significance of HE4 expression in pulmonary adenocarcinoma*. Tumour Biol. 32(2): p. 265-71.
105. Xi, Z., M. LinLin, and T. Ye, *Human epididymis protein 4 is a biomarker for transitional cell carcinoma in the urinary system*. J Clin Lab Anal, 2009. 23(6): p. 357-61.
106. Moore, R.G., et al., *Utility of Tumor Marker HE4 to Predict Depth of Myometrial Invasion in Endometrioid Adenocarcinoma of the Uterus*. Int J Gynecol Cancer. 21(7): p. 1185-90.
107. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. 1960. Obes Res, 1996. 4(6): p. 583-600.
108. Wide, L. and J. Porath, *Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1966. Volume 130(Issue 1): p. Pages 257-260.
109. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. 51(12): p. 2415-8.
110. Van Weemen, B.K. and A.H. Schuurs, *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Lett, 1971. 15(3): p. 232-236.
111. Schuurs, A.H. and B.K. van Weemen, *Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool*. J Immunoassay, 1980. 1(2): p. 229-49.
112. Keith, R.A., et al., *The functional independence measure: a new tool for rehabilitation*. Adv Clin Rehabil, 1987. 1: p. 6-18.
113. Cockcroft, D.W. and M.H. Gault, *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron, 1976. 16(1): p. 31-41.
114. Kristich, C.J., et al., *Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in Enterococcus faecalis*. MBio, 2011. 2(6): p. e00199-11.
115. Matteson, J.R., et al., *Medicolegal aspects of testicular torsion*. Urology, 2001. 57(4): p. 783-6; discussion 786-7.
116. Bingle, L., et al., *WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung*. Respir Res, 2006. 7: p. 61.
117. Moore, R.G., et al., *A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass*. Gynecol

- Oncol, 2009. 112(1): p. 40-6.
118. Plotti, F., et al., *Does HE4 have a role as biomarker in the recurrence of ovarian cancer?* Tumour Biol, 2012. 33(6): p. 2117-23.
119. Montagnana, M., et al., *HE4 in ovarian cancer: from discovery to clinical application.* Adv Clin Chem, 2011. 55: p. 1-20.
120. Moore, R.G., et al., *Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus.* Gynecol Oncol, 2008. 110(2): p. 196-201.
121. Bolstad, N., et al., *Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population.* Tumour Biol, 2012. 33(1): p. 141-148.
122. Bandiera, E., et al., *Serum human epididymis protein 4 and risk for ovarian malignancy algorithm as new diagnostic and prognostic tools for epithelial ovarian cancer management.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. 20(12): p. 2496-506.
123. Yamashita, S., et al., *Serum level of HE4 is closely associated with pulmonary adenocarcinoma progression.* Tumour Biol, 2012. 33(6): p. 2365-70.
124. Moore, R.G., et al., *Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age.* Am J Obstet Gynecol, 2012. 206(4): p. 349 e1-7.
125. Anastasi, E., et al., *Ovarian tumor marker HE4 is differently expressed during the phases of the menstrual cycle in healthy young women.* Tumour Biol, 2010. 31(5): p. 411-5.
126. Mokhtar, N., et al., *Human epididymis protein 4 reference intervals in a multiethnic asian women population.* Asian Pac J Cancer Prev, 2012. 13(12): p. 6391-5.
127. Hertlein, L., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases.* Clin Chem Lab Med, 2012.
128. Nagy, B., Jr., et al., *Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease.* Ann Clin Biochem, 2012. 49(Pt 4): p. 377-80.
129. Anderson, G.L., et al., *Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study.* J Natl Cancer Inst. 102(1): p. 26-38.
130. Vaz Perez, A., et al., *The impact of impaired renal function on mortality in patients with acutely decompensated chronic heart failure.* Eur J Heart Fail.

- 12(2): p. 122-8.
131. Beck, A.W., et al., *Predicting 1-year mortality after elective abdominal aortic aneurysm repair*. J Vasc Surg, 2009. 49(4): p. 838-43; discussion 843-4.
 132. Speziale, F., et al., *Factors influencing outcome after open surgical repair of juxtarenal abdominal aortic aneurysms*. Vascular. 18(3): p. 141-6.
 133. Charlson, M.E., et al., *A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation*. J Chronic Dis, 1987. 40(5): p. 373-83.
 134. Moore, R.G., et al., *Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass*. Am J Obstet Gynecol. 203(3): p. 228 e1-6.
 135. Fritz-Rdzanek, A., et al., *HE4 protein and SMRP: Potential novel biomarkers in ovarian cancer detection*. Oncol Lett, 2012. 4(3): p. 385-389.
 136. Park, Y., et al., *Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases*. Clin Biochem, 2011. 44(10-11): p. 884-8.
 137. Park, Y., et al., *Reference ranges for HE4 and CA125 in a large Asian population by automated assays and diagnostic performances for ovarian cancer*. Int J Cancer, 2012. 130(5): p. 1136-44.
 138. Kalapotharakos, G., et al., *High preoperative blood levels of HE4 predicts poor prognosis in patients with ovarian cancer*. Journal of Ovarian Research, 2012. 5(1): p. 20.
 139. Chudecka-Głaz, A., I. Rzepka-Górska, and I. Wojciechowska, *Human epididymal protein 4 (HE4) is a novel biomarker and a promising prognostic factor in ovarian cancer patients*. European journal of gynaecological oncology, 2012. 33(4): p. 382-390.
 140. Angioli, R., et al., *Can the preoperative HE4 level predict optimal cytoreduction in patients with advanced ovarian carcinoma?* Gynecol Oncol, 2013. 128(3): p. 579-83.
 141. Hamed, E.O., et al., *Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response*. Diagn Pathol, 2013. 8: p. 11.
 142. Zanotti, L., et al., *Human epididymis protein 4 as a serum marker for diagnosis of endometrial carcinoma and prediction of clinical outcome*. Clin Chem Lab

- Med, 2012. 50(12): p. 2189-98.
143. Steffensen, K.D., et al., *The prognostic and predictive value of combined HE4 and CA-125 in ovarian cancer patients*. Int J Gynecol Cancer, 2012. 22(9): p. 1474-82.
144. Mutz-Dehbalai, I., et al., *HE4 is an independent prognostic marker in endometrial cancer patients*. Gynecol Oncol, 2012. 126(2): p. 186-91.
145. Trudel, D., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) and ovarian cancer prognosis*. Gynecol Oncol, 2012. 127(3): p. 511-5.
146. Paek, J., et al., *Prognostic significance of human epididymis protein 4 in epithelial ovarian cancer*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011. 158(2): p. 338-42.
147. Kong, S.Y., et al., *Serum HE4 level is an independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer*. Ann Surg Oncol, 2012. 19(5): p. 1707-12.
148. Kamei, M., et al., *HE4 expression can be associated with lymph node metastases and disease-free survival in breast cancer*. Anticancer Res. 30(11): p. 4779-83.
149. Yamashita, S.I., et al., *Prognostic significance of HE4 expression in pulmonary adenocarcinoma*. Tumour Biol, 2010.
150. Iwahori, K., et al., *Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer*. Tumour Biol, 2012. 33(4): p. 1141-9.
151. Schummer, M., et al., *Evaluation of ovarian cancer remission markers HE4, MMP7 and Mesothelin by comparison to the established marker CA125*. Gynecol Oncol, 2012. 125(1): p. 65-9.
152. Pilatz, A., et al., *Clinical evaluation of human epididymis protein 4 as a biomarker for epididymitis*. Biomark Med, 2012. 6(3): p. 311-7.
153. Anastasi, E., et al., *HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer*. Tumour Biol. 31(2): p. 113-9.
154. Plebani, M., *HE4 in gynecological cancers: report of a European investigators and experts meeting*. Clin Chem Lab Med, 2012.
155. Moore, R.G., et al., *Utility of tumor marker HE4 to predict depth of myometrial invasion in endometrioid adenocarcinoma of the uterus*. Int J Gynecol Cancer, 2011. 21(7): p. 1185-90.
156. Gao, L., et al., *The role of HE4 in ovarian cancer: inhibiting tumour cell proliferation and metastasis*. J Int Med Res, 2011. 39(5): p. 1645-60.
157. Li, J., et al., *HE4 (WFDC2) Promotes Tumor Growth in Endometrial Cancer*

- Cell Lines*. Int J Mol Sci, 2013. 14(3): p. 6026-43.
158. Zou, S.L., et al., *Effect of human epididymis protein 4 gene silencing on the malignant phenotype in ovarian cancer*. Chin Med J (Engl), 2011. 124(19): p. 3133-40.
159. Lu, R., et al., *Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 419(2): p. 274-80.
160. Wang, S., et al., *Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care*. Lab Chip, 2011. 11(20): p. 3411-8.
161. LeBleu, V.S., et al., *Identification of human epididymis protein-4 as a fibroblast-derived mediator of fibrosis*. Nat Med, 2013. 19(2): p. 227-31.

12. Publikationsverzeichnis

12.1 Originalarbeit

1. Pilatz A, **Bürger M**, Lüdecke G, Wagenlehner F, Weidner W. Clinical evaluation of human epididymis protein 4 as a biomarker for epididymitis. *Biomark Med.* 2012 Jun;6(3):311-7
2. Pilatz, A, **Bürger M**, Wagenlehner F, Hossain H, Weidner W. Acute epididymitis: Etiology and inflammatory parameters in a prospective study. *The Journal of Urology*, 2011. 185(4): p. e569.

12.2 Vorträge und Posterpräsentationen

1. A. Pilatz, **M. Bürger**, F. Wagenlehner, H. Hossain, W. Weidner. Acute epididymitis: Etiology and inflammatory parameters in a prospective study. American Urological Association (AUA) 2011 Annual Scientific Meeting, Washington / DC, Mai 2011
2. A. Pilatz, **M. Bürger**, G. Lüdecke, F. Wagenlehner, W. Weidner. Untersuchung des humanen Epididymis Protein 4 (HE4) als Biomarker der Epididymitis. 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Düsseldorf, September 2010

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische und datenschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. W. Weidner, Direktor der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH - Standort Giessen-, für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. F. Wagenlehner, leitender Oberarzt der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH - Standort Giessen-, gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des interessanten Themas.

Auch danke ich Herrn Dr. med. G. Lüdecke, Oberarzt der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH - Standort Giessen-, und Herrn Dr. J. Pons-Kuehnemann (AG Medizinische Statistik, Institut für Medizinische Informatik, Justus-Liebig-Universität Giessen) für ihre freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Adrian Pilatz, Facharzt für Urologie der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH -Standort Giessen-, für seine exzellente Betreuung, seine bereichernden Anregungen und immer freundliche sowie unkomplizierte Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des urologischen Forschungslabors, namentlich sei hier Frau Kerstin Wilhelm erwähnt, für die Einführung in die Laborarbeit und Hilfestellungen bei den Durchführungen der Tests bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung und Geduld bei der Anfertigung der Arbeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**