

Aus der Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In-vitro Untersuchungen des zytotoxischen und gentoxischen
Potentials von humanen Magensäften als Grundlage der
Krebsentstehung des oberen Gastrointestinaltraktes

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrick Strube

aus Halle (Saale)

Gutachter: 1. PD Dr. med. B. Sedlmaier
2. Prof. Dr. med. M. Bloching
3. PD Dr. med. P. Mir-Salim

Datum der Promotion: 19.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Tumorentstehung	5
1.2	Rolle chronischer Entzündungen in der Kanzerogenese	11
1.3	Gastro- und extraösophageale Refluxerkrankung	17
1.4	Rolle der gastro- und extraösophagealen Refluxerkrankung in der Kanzerogenese des oberen Gastrointestinaltraktes	21
2.	Zielstellung	27
3.	Material und Methoden	29
3.1	Material	29
3.2	Säugerzellkulturen	32
3.3	Testsubstanzen	33
3.3.1	Vorversuch zur Bestimmung der Pufferwirkung des Kulturmediums	33
3.3.2	Gewinnung der Magensaftproben	33
3.4	Biologische Testsysteme	35
3.4.1	Durchflußzytometrische Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Propidiumjodid	36
3.4.1.1	Grundlagen	36
3.4.1.2	Ablauf	37
3.4.2	Bestimmung der Apoptoserate mittels (Mitochondrien-)Membranpotential-Test	38
3.4.2.1	Grundlagen	38
3.4.2.2	Ablauf	38
3.4.2.3	Auswertung	39
3.4.3	Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin-FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und Propidiumjodidmarkierung	40
3.4.3.1	Grundlagen	40
3.4.3.2	Ablauf	40
3.4.3.3	Auswertung	41
3.4.4	Bestimmung von Apoptose durch den Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen (Cell Death Detection ELISA ^{plus} [CDD ⁺])	41
3.4.4.1	Grundlagen	41
3.4.4.2	Ablauf	42
3.4.4.3	Auswertung	42
3.4.5	Bestimmung von Apoptose durch fluorimetrische Messung der apoptoseinduzierten Caspaseaktivitäten	43
3.4.5.1	Grundlagen	43
3.4.5.2	Ablauf	43
3.4.5.3	Auswertung	44
3.4.6	Bestimmung der Gentoxizität (Mikrokern-Test)	44
3.4.6.1	Grundlagen	44
3.4.6.2	Ablauf	45
3.4.6.3	Auswertung	46
3.5	Statistische Auswertung	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Testergebnisse des Vorversuchs	49
4.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung	50
4.2.1	Testergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Zytotoxizität mittels Propidiumjodid	51

4.2.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mittels des Mitochondrien-Membranpotential-Tests (MMP+-Test).....	55
4.2.3	Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mittels Annexin-FITC-Tests.....	57
4.2.4	Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung mittels des Nukleosomen Nachweises (CDD+-ELISA).....	60
4.2.5	Ergebnisse des Caspase-Assays	63
4.3	Ergebnisse der Gentoxizitätsprüfung mittels Mikrokerntest.....	67
4.3.1	Testergebnisse nach Säureexposition.....	67
4.2.2	Testergebnisse nach Exposition von Magensaft	69
5.	Diskussion.....	71
5.1	Generelle Ergebnisse der geprüften Hypothesen.....	71
5.2	Ergebnisse der Zytotoxizitätstests	73
5.2.1	Apoptose.....	73
5.2.2	Nekrose.....	76
5.2.3	Diskussion der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests mit der wissenschaftlichen Literatur.....	77
5.3	Ergebnisse der Gentoxizitätsuntersuchungen.....	80
5.3.1	Mikrokerntest	80
5.3.2	Diskussion der Ergebnisse des Mikrokerntests mit der wissenschaftlichen Literatur.....	80
5.4	Zukünftiger Forschungsbedarf	83
5.5	Schlussfolgerungen.....	84
6.	Zusammenfassung.....	85
7.	Literaturverzeichnis.....	87

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Krebserkrankungen sind weltweit auf dem Vormarsch. In den westlichen Industrienationen liegen sie in der Todesursachenstatistik an zweiter Stelle direkt nach den Herz-Kreislaufkrankungen. Derzeit geht man davon aus, dass ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland auf Krebs zurückzuführen ist [1].

Obwohl Krebs eine heterogene Gruppe von Erkrankungen nahezu sämtlicher Organe darstellt, lassen sich einige Gemeinsamkeiten aller Krebserkrankungen aufzählen [2]. Es liegt eine Gewebsneubildung in Form einer abnormen Gewebsmasse vor, welche durch exzessive, unkontrollierte und progressive Proliferation ursprünglich körpereigener Zellen entsteht. Mit der Proliferation verlieren die Zellen in der Regel sowohl die Fähigkeit zur weiteren Differenzierung als auch die Eigenschaft zur Kontaktinhibition sowie die lokale topographische Bindung. Weiterhin kommt es zu einer Instabilität des Chromosomensatzes mit Prädisposition zu Chromosomenbrüchen, Chromosomenfehlverteilungen, Aneuploidie und Genmutationen. Die Proliferation der Tumorzellen wird durch einen gewissen Reiz ausgelöst, bleibt später autonom und nahezu unabhängig vom Organismus. Der Einfluss auf die entarteten Zellen beschränkt sich meist nur auf hormonelle Stimuli oder perfusionsbedingte Abhängigkeit.

Aus heutiger Sicht liegt die Ursache einer derartigen malignen Transformation körpereigener Zellen in der Mutation von Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen oft in Kombination mit epigenetischen Veränderungen [3, 4]. Die Produkte der Protoonkogene dienen normalerweise als Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, als G-Proteine sowie als Transkriptionsfaktoren der DNA. Tumorsuppressorgene codieren Wachstumskontrollmechanismen und entscheiden an gewissen Kontrollpunkten im Zellzyklus, ob eine Zelle in die Synthese- oder Mitosephase eintreten darf oder apoptotisch wird bzw. im Arrest bleibt. Sie agieren gewissermaßen als Gegenspieler der Protoonkogene, quasi als Anti-Protoonkogen. Es liegt nahe, dass sowohl eine Überexpression bzw. eine fehlende Deaktivierung wachstumsstimulierender Signaltransduktionswege als auch ein fehlender Teilungsstopp oder eine nicht initiierte Apoptose, ein Ungleichgewicht von Zellteilung aktivierenden und inaktivierenden Faktoren darstellen. Somit kommt es zu einer Störung des normal ablaufenden Zellzyklus (Abbildung 1) [4, 5]. Die Aufgabe der DNA-Reparaturgene ist ein Garantieren der genetischen Stabilität der DNA durch Steuerung der Korrektur entstandener genetischer Defekte an besagten Prüfpunkten des Zellzyklus. Sind die DNA-Reparaturmechanismen gestört, führt dies zu einer gesteigerten Mutationsrate und somit zu einem erhöhten Krebsrisiko [4].

Epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen begünstigen das Zellzyklusungleichgewicht, indem sie Transkriptionsraten von Tumorsuppressorgenen, Onkogenen und DNA-Reparaturgenen verändern sowie das Entstehen von Mutationen betreffender Gene durch Steigerung der Sensibilität gegenüber Umweltfaktoren begünstigen [6].

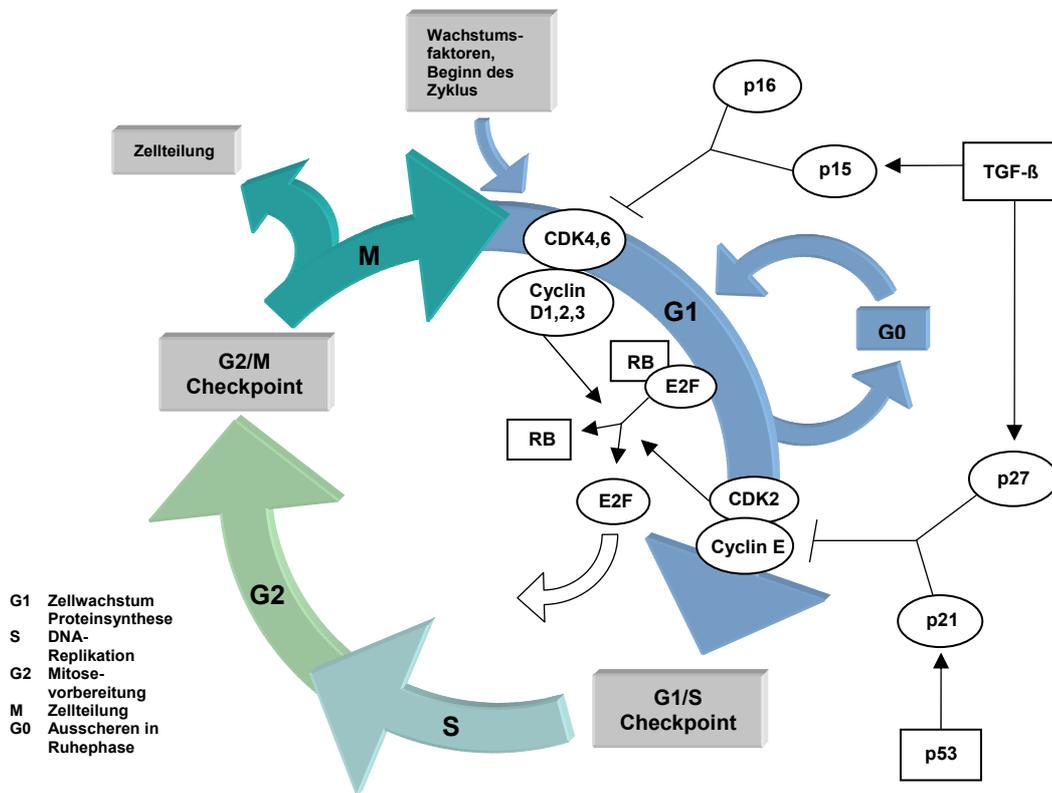


Abbildung 1. Grundprinzip des Ablaufs des Zellzyklus. Wachstumsfaktoren induzieren den Übergang von der Ruhephase in die G1-Phase des Zellzyklus. Vor der S-Phase und der Mitose (M) existieren Prüfpunkte (Checkpoints), die der Kontrolle des korrekten Ablaufs des Zellzyklus dienen und gegebenenfalls den Eintritt Zellzyklusblock, DNA-Reparatur und Apoptose koordinieren. Gesteuert wird der Kreislauf über zu unterschiedlichen Phasen aktivierte Proteinkinasen (Cyclin-dependent kinases – CDK). Diese bilden Komplexe mit regulatorischen Proteinen, sogenannten Cyclinen. Exemplarisch dargestellt als Substrat der CDK-Komplexe ist das Tumorsuppressorprotein RB. Dessen Phosphorylierung durch CDK der G1-Phase führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, was den Übergang in die S-Phase einleitet. Weiterhin beispielhaft dargestellt ist die Einflussnahme der Tumorsuppressorgene p53, p15, p16, p21 und p27 während der G1-Phase, wobei p53 sowohl die Apoptose als auch einen G1-Block triggert. (nach Funk und Kind 1997, Kassen und Hofmöckel 2003) [4, 5]

Mutationen dieser Gene können sowohl spontan erfolgen, als auch durch endogene oder exogene Faktoren ausgelöst werden. So produziert der zelluläre Metabolismus des menschlichen Organismus ständig reaktive chemische Zwischenprodukte, die das Erbgut potenziell schädigen können [7]. Außerdem rechnet man mit ca. 10.000 spontanen Depurationen der DNA jeder

Zelle pro Tag [8]. Ebenso hoch schätzt man die Zahl der durch reaktive oxidative Metabolite verursachten Schädigungen der DNA in jeder Zelle des Menschen. DNA-Reparaturenzyme eliminieren die meisten, jedoch nicht alle dieser Defekte, so dass oxidative Schäden über die Lebenszeit akkumulieren [9]. Eine weitere endogene Mutationsquelle liegt im fehlerhaften Arbeiten der DNA-Polymerasen durch Einfügen falscher Nukleotide [10, 11]. Auch hier existieren Mechanismen, wie das DNA-Mismatch-Reparatursystem, welche fehleringebaute Nukleotide wieder aus der DNA herauschneiden und Defektresiduen minimieren [11]. (Abbildung 2[I.]

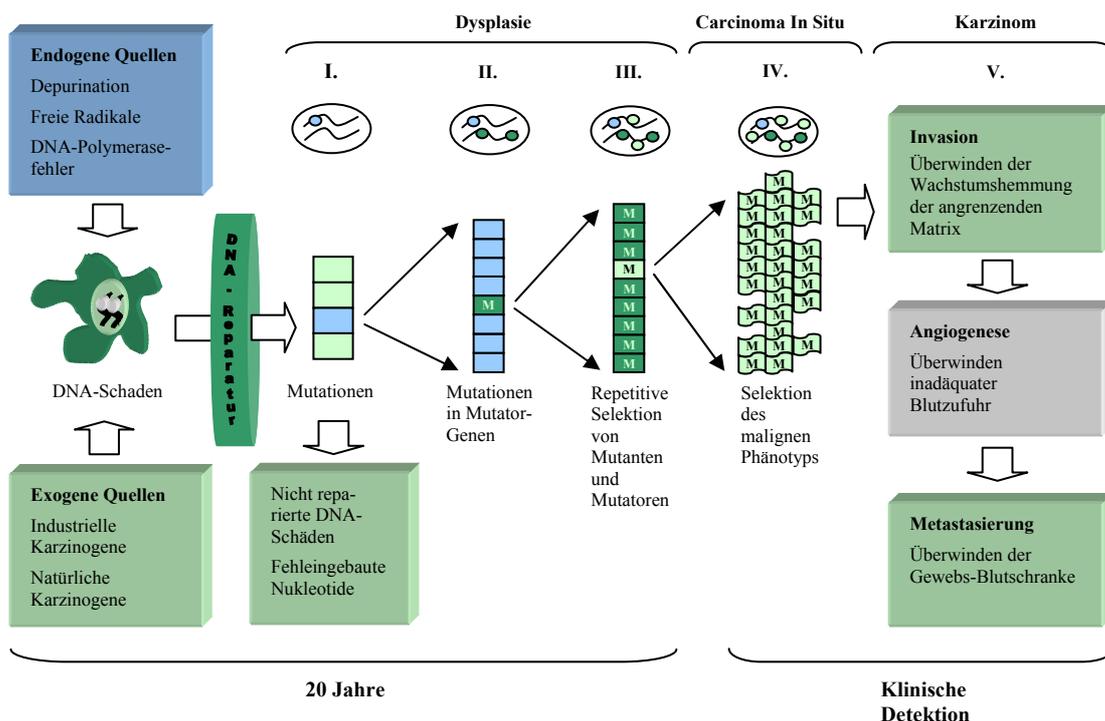


Abbildung 2. Evolution eines Tumors basierend auf der Selektion von Mutator-Mutationen. I. Faktoren, die zur Akkumulation von Mutationen in Krebszellen führen, wenn die DNA-Reparaturkapazität überschritten wird. Es existiert ein dynamisches Äquilibrium zwischen DNA-Schädigung und DNA-Reparatur, welches in Krebszellen gestört ist. II. Aus zufälligen Mutationen können klonale Expansion und Mutationen in Mutator-Genen (M) resultieren. III. Jede wiederholte Selektion von Mutanten führt zu zusätzlicher Koselektion von Mutanten in Mutator-Genen. IV. Entstehung des malignen Phänotyps. V. Aus der Population der Krebszellen, werden Mutanten selektiert, die weitere Wachstumsbarrieren durchbrechen. (nach Jackson und Loeb 1998, Loeb und Loeb 2000, Loeb 2001) [10-12]

Die Entgiftung sowohl endogener als auch exogener Metabolite unterliegt einer Reihe von Enzymen, wie z.B. der Cytochrom-P450-Isoenzyme und der Glutathion-S-Transferase. Diese Enzyme haben eine große interindividuelle Variationsbreite hinsichtlich ihrer Aktivität auf Grund von Genpolymorphismen und beeinflussen so die Wahrscheinlichkeit von Mutationen durch sowohl endogene als auch exogene Faktoren [13, 14].

Als exogene Mutagene kommen eine heterogene Gruppe von Umweltfaktoren in Frage, die auf ebenso verschiedene Weise das Erbgut schädigen können und wahrscheinlich auf diesem Weg eine tragende Rolle in der Krebsgenese spielen. Hierbei können sowohl chemische und physikalische, als auch biologische Noxen, wie Mikroorganismen, die maligne Entartung induzieren.

Das Risiko, diese Entartung zu vollziehen, umfasst ein komplexes Aufeinanderwirken von sowohl endogenen als auch exogenen mutagenen Einflüssen auf die genetische, im Sinne der Proto-Onko-, Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgene, und epigenetische individuelle Empfindlichkeit [15]. Bei diesem Prozess kommt die genetische Prädisposition des Individuums, einen Krebs zu entwickeln, zum Tragen. Sie wird repräsentiert durch diverse Erblinienmutationen, unter anderem Tumorsuppressorgene betreffend, wie p53, APC, BRCA1 und BRCA2, welche die Anzahl weiterer Mutationsschritte reduzieren, die notwendig sind, um eine maligne Transformation auszulösen [16-18]. Auf diese Weise variiert die individuelle Wahrscheinlichkeit eines Auftretens verschiedener Krebsarten während der Lebenszeit und es erklärt sich die familiäre Häufung z.B. von Brustkrebs oder früh auftretendem Kolonkrebs bzw. die Vererbbarkeit mancher Krebserkrankungen wie z.B. Xeroderma pigmentosum oder des Retinoblastoms (Abbildung 3) [13, 16, 17].

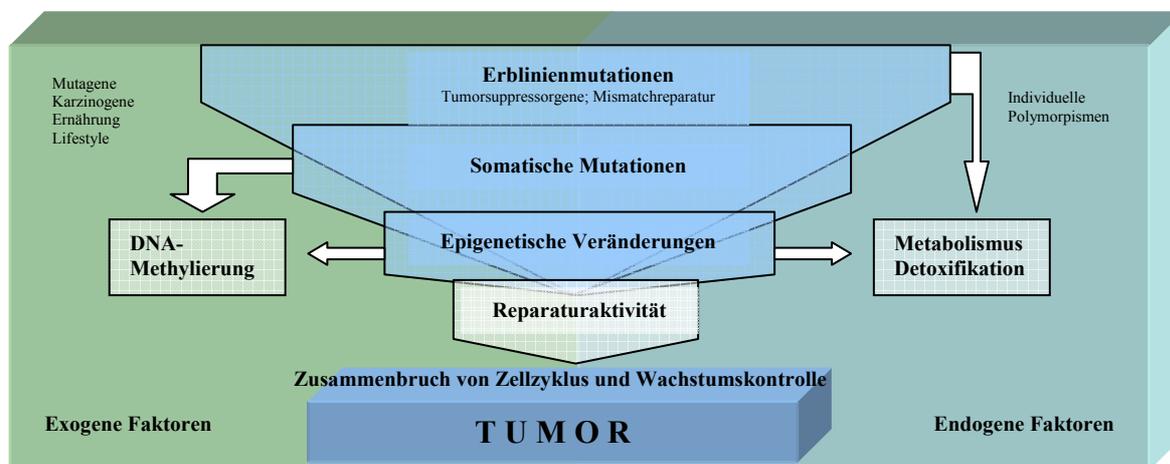


Abbildung 3. Zusammenwirken umweltabhängiger und umweltunabhängiger Faktoren auf die Tumorentstehung (nach Minamoto et al. 1999) [13]

Die Tatsache, dass die Inzidenz der meisten Karzinome im zunehmenden Alter, etwa im fünften bis siebten Dezennium, scharf ansteigt, legt ebenso wie die Beobachtungen gehäufte somatischer Mutationen in Krebszellen, nahe, dass es einer Reihe dieser, das Genom schädigenden, Ereignisse bedarf, um eine maligne Entartung zu erreichen [19-21]. Die genaue

Anzahl solcher Mutationsschritte scheint je nach Krebsart variabel. So errechnete Knudson 2001, dass zur Entwicklung spontaner, nicht hereditärer Retinoblastome zwei Einzelmutationen ausreichend sind [22]. Auf der anderen Seite zeigen statistische Auswertungen und experimentelle Untersuchungen, dass es vier bis sechs Mutationsschritte bedarf, bis ein Kolonkarzinom entsteht [21, 23].

Der Prozess, wie das Wirken unterschiedlicher Faktoren über einen Zeitraum die Krebsentstehung hervorruft, wird beschrieben, durch das in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte Mehrstufenmodell der Karzinogenese, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression [24]. Die Initiation kann sowohl durch endogene als auch exogene Mutagene erfolgen. Der Initiator kann für sich allein in geringer Konzentration keinen Krebs auslösen. Er kann lediglich das onkogene Potential einer Zelle erwecken, also die Krebsentstehung initiieren. Für diesen Vorgang muss er jedoch drei Voraussetzungen erfüllen (zit. Schmitz-Moormann et al. 1995) [2]:

- a) Das Karzinogen muss eine Mutation mit Umwandlung eines Protoonkogens in ein Onkogen bzw. eine Inaktivierung oder Deletion eines Tumorsuppressorgens hervorrufen.
- b) Die mutierte Zelle muss teilungsfähig sein.
- c) Die Mutation darf nicht durch die Reparaturmechanismen der Zelle beseitigt werden.

Aus diesem Grund kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der DNA, die an die Tochterzellen weitergegeben wird. Der zellschädigende Prozess, der vom Zeitpunkt der Initiation bis hin zur vollständigen Entartung der Zelle überleitet, wird durch die Promotion charakterisiert. Der Promotor hat selbst keine kanzerogenen Eigenschaften, auch nicht nach wiederholter Applikation. Er wirkt als dosisabhängiger und oft reversibler, unspezifischer Proliferationsreiz auf die Zelle und kann auf diese Weise die Latenzzeit bis zur Progressionsphase verkürzen. Trosko et al. formulierten 1983, dass Promotion am besten als mitogener nicht mutagener Prozess zu beschreiben sei [25]. Eine Umkehr der Reihenfolge von Initiation und Promotion führt auf Grund der beschriebenen Eigenschaften dieser Vorgänge nicht zur malignen Transformation. Progression beschreibt letztendlich den Schritt, bei dem die initiierte Zelle irreversibel zum malignen Phänotyp übergeht, der ohne Promotoreinfluss autonome Proliferation zeigt. Dies wird wahrscheinlich durch ein weiteres mutagenes oder ein stabiles epigenetisches Ereignis ausgelöst [26].

Eine derartig veränderte Zelle verschafft sich durch Selektionsdruck eine Art evolutionären Vorteil in ihrer Mikroumgebung und entzieht sich somit lokalen und systemischen Regulationsmechanismen des Organismus [27]. Sie kann sich ungehemmt teilen, sodass eine

monoklonale Gewebemasse entsteht, welche die Fähigkeit besitzt, umliegendes Gewebe zu verdrängen beziehungsweise zu ersetzen [28].

Die Selektion mutierter Zellklone spielt sich im Kontext des umliegenden Gewebes ab, wobei eine erhöhte Mutationsrate im heterogenen histologischen Hintergrund zu erwarten ist, welche wiederum eine weitere Progression wahrscheinlicher macht [29]. Das Mosaik der unterschiedlichen Genotypen und Phänotypen im präkanzerösen Gewebe hemmt sich gegenseitig in Proliferation und Expansion, so dass ein quasi stabiler Status erreicht wird, bis ein Zellklon es schafft, sich über die lokalen Hemmmechanismen hinwegzusetzen [30]. Auf diese Weise vollzieht sich ein Wechsel von Heterogenität im prämaligen zur Homogenität im malignen Zellverband [31].

Die stufenweise Selektion mutierter Zellklone spielt also eine maßgebliche Rolle in der Karzinogenese, was zahlreiche Experimente belegen [30]. Akkumulieren auf diesem Weg bestimmte Mutationen, wird es dem veränderten Zellverband möglich, weitere Wachstumsbarrieren zu durchbrechen (Abbildung 2). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Körperzelle innerhalb eines Menschenlebens eine Anzahl derartiger Mutationen erreicht, ist verschwindend gering [12]. Dies widerspricht jedoch den Beobachtungen über Mutationshäufigkeiten in Krebszellen und dem häufigen Auftreten von Krebserkrankungen. Eine Erklärung findet man der erhöhten genetischen Instabilität der Krebszellen, sowohl auf Einzel-Nukleotid-Ebene im Sinne von Punktmutationen, auf Ebene repetitiver Mikrosatellitensequenzen im Sinne von Frameshift-Mutationen als auch auf chromosomaler Ebene im Sinne von Translokationen, Deletionen, Amplifikationen und Aneuploidie [11, 32]. All diese Formen der gesteigerten genetischen Instabilität sind vereinbar mit einem sogenannten Mutator-Phänotyp [10, 11]. Dieser wird charakterisiert durch exo- oder endogen hervorgerufene Mutationen in Genen, welche die genetische Stabilität konservieren und in Prozesse wie DNA-Reparatur, DNA-Replikation, Chromosomen-Segregation, Zellzykluskontrolle und Apoptose involviert sind (Abbildung 2) [10, 29].

Abschließend bleibt ein vollständiges Bild der Kanzerogenese noch ausstehend, weshalb intensive Forschung zur Aufklärung detaillierter Prozesse betrieben wird. Aus demselben Grund werden immer wieder neue Theorien veröffentlicht, die sich teilweise mit moderneren Ansichten überschneiden oder alte Ideen wieder aufgreifen, wie z.B. dass Krebsentstehung ein zufälliger nichtadaptiver Prozess sei, verursacht durch genetischen Drift oder die ‚Tissue organization field theory‘ von Sonnenschein und Soto 2000, in der die Entartung von Zellen zu Krebszellen seinen Platz in der gewebshierarchischen Ebene der Komplexizität findet und aus veränderten Zell-Zell- und Gewebs-Gewebs-Interaktionen resultiert [33, 34].

1.2 *Rolle chronischer Entzündungen in der Kanzerogenese*

Epidemiologische Untersuchungen verschiedener Krebsarten konnten in den letzten Jahren einen chronisch inflammatorischen Hintergrund der Entstehung von Tumoren nachweisen. So stehen 15-20% aller Krebstode mit chronischen Entzündungen oder Infektionen in Verbindung [35].

Schon Virchow stellte 1893 auf Grund seiner Beobachtungen die Hypothese auf, dass maligne Neoplasien auf chronischen Entzündungsreaktionen basieren. Er begründete die Hypothese mit der Gewebsproliferation, welche während einer Entzündungsreaktion nach Gewebsverletzung durch „Irritantien“ stattfindet [36].

Die genauen biologischen und biochemischen Abläufe werden erst seit kurzem untersucht. Je nach Krebsart kommen als Auslöser für eine derartige chronische Entzündung wie für Krebs selbst sowohl Infektionen durch Viren, Bakterien oder andere pathogenen Mikroorganismen als auch rezidivierende Gewebsverletzungen durch physikalische und chemische Noxen sowie eine autoimmune Genese in Frage [37, 38].

Infektionen werden für 20-25% aller Krebstode in Entwicklungsländern und für 7-10% aller Krebstode in den industrialisierten Nationen als ursächlich angesehen [38]. Die Infektion durch den Erreger ist als alleinige Ursache der Krebsentstehung jedoch nicht ausreichend. Weitere Faktoren, welche in somatischen Mutationen oder epigenetischen Ereignissen münden, sind hierfür zwingend notwendig [39].

Eine Übersicht über chronisch-infektbedingte Krebstypen gibt Tabelle 1.

Als physikalische Ursache einer chronischen Entzündungsreaktion mit entsprechender maligner Transformation nach Jahren kommt die Exposition gegenüber verschiedenen Strahlenarten in Frage wie z.B. ultraviolette Strahlung. Diese mündet primär in eine akute, bei wiederholter oder chronischer Exposition in eine chronische Entzündungsreaktion [40]. Nach Jahren der UV-Strahlen-Exposition der Haut treten gehäuft dermale Karzinome, wie z.B. maligne Melanome auf [41]. Experimentell konnte eine erhöhte Rate der Tumorentstehung bei chronischer Entzündung der UV-exponierten Haut nachgewiesen werden [42].

Die Gruppe der, auf den menschlichen Körper einwirkenden, chemischen Substanzen ist sehr vielfältig. Einige Stoffe sind auch ohne direkt oder indirekt kanzerogenes Potential je nach Expositionsart, Substanz und Expositionsdauer in der Lage, zum Teil chronische Entzündungsreaktionen auszulösen. Die Substanzen sind sowohl exogener als auch endogener Natur.

Tabelle 1. Krebstypen, verursacht durch chronische Infektion spezifischer Erreger

Erregertyp	Kausaler Erreger	Krebstyp	Literaturangabe
Viral	Epstein-Barr-Virus (EBV)	Non-Hodgkin-Lymphom Hodgkin-Lymphom Nasopharynxkarzinom	[43-45]
	Humane Papilloma Viren (HPV)	Anogenitale Karzinome Oropharyngeale Karzinome Larynxkarzinome	[46, 47]
	Hepatitis B oder C Viren (HBV, HCV)	Hepatozelluläres Karzinom	[48]
	Humanes Immunodefizienz Virus (HIV)	Non-Hodgkin-Lymphom Hodgkin-Lymphom Kaposi-Sarkom	[49, 50]
Bakteriell	Helicobacter pylori	Adenokarzinom des Magens B-Zell-Lymphom	[51, 52]
andere Mikroorganismen	Opisthorchis viverrini Clonorchis sinensis	Cholangiokarzinom	[53, 54]
	Schistosoma haematobium	Plattenepithelkarzinome des Urogenitaltraktes	[55]

Eine Auswahl derartiger inflammatorischer Prozesse, welche mit einem spezifisch erhöhten und epidemiologisch gesicherten Krebsrisiko einhergehen gibt Tabelle 2 wieder.

Einige chronisch-entzündliche Erkrankungen sind epidemiologisch nachweisbar mit einem erhöhten Risiko der Entstehung maligner Tumore assoziiert. Zum Großteil sind diese Prozesse autoimmuner Genese. Als Beispiel hierfür sind v.a. die chronischen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu nennen. Beide können nach Jahrzehnten entzündlicher Aktivität in Adenokarzinome des Darmes münden, woraus schließlich ein Entartungsrisiko von 0,5-1% pro Jahr nach 10-15 Jahren Krankheitsaktivität resultiert [37, 56]. Weitere Beispiele für ein erhöhtes Krebsrisiko aufgrund chronisch-entzündlicher Erkrankungen sind die chronische Cholezystitis, welche in Verbindung mit langjährig bestehenden Gallensteinen ein dreifach erhöhtes Risiko für Gallenwegskarzinome aufweist sowie die inflammatorische Prostataatrophie hinsichtlich des Prostatakarzinoms [57, 58].

Tabelle 2. Krebstypen, verursacht durch chronische Entzündung aufgrund chemischer Noxen

Substanzquelle	Substanz / Mechanismus	Krebstyp	Literaturangabe
Endogen	Magensäure (HCl) / Refluxösophagitis	Adenokarzinom des distalen Ösophagus / Kardia	[59]
Exogen	Zigarettenrauch / Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	Lungenkarzinom	[60, 61]
	Silikat, Asbest / Chronisch diffus- infiltrative Lungenerkrankung	Lungenkarzinom	[62]

Um den Einfluß chronischer Entzündungen auf die Krebsentstehung beurteilen zu können, muss man primär das Wesen der chronischen Entzündung selbst beleuchten. Chronische Entzündungen entstehen aus akuten Entzündungsreaktionen, in denen die entzündungsauslösende Noxe durch den Entzündungsmechanismus nicht beseitigt werden konnte oder diese rezidivierend den Organismus schädigt [39, 63]. Die normalerweise stattfindende akute Entzündungsreaktion ist selbstlimitierend und endet in einer Restitutio ad integrum beziehungsweise in einem Defektzustand wie zum Beispiel einer Narbe. Eine Restitutio ad integrum wird aus verschiedenen Gründen bei chronischen Reaktionen nicht erreicht [63].

Die Auslöser für die Entzündungskaskade sind entweder körperfremde Antigene oder durch eine gewebeschädigende Noxe freigesetzte intrazelluläre Antigene. Ortsständige Leukozyten (Lymphozyten, Makrophagen) erkennen die fremden Antigene und produzieren proinflammatorische Zytokine (Gewebshormone) und Chemokine (chemotaktische Substanzen) [63-65]. Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen (neutrophile, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten sowie sekundär Monozyten) aus Blutgefäßen [36]. Ortsständige Mastzellen sind ebenfalls involviert [63].

Die aktivierten Granulozyten und Monozyten bilden zur potentiellen Erregerabwehr reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite, welche wiederum Lipide in Zellmembranen peroxidieren und somatische Mutationen verursachen [39, 63, 64, 66]. Während der Entzündungsreaktion sezernieren vor allem die in Makrophagen transformierten Monozyten sowie ortsständige Mastzellen weitere Chemokine, proinflammatorische Zytokine, antiapoptotische Signalsubstanzen, Wachstums- und Angiogenesefaktoren und steuern über Zusammensetzung

dieser Faktoren in der extrazellulären Matrix endotheliale, epitheliale sowie mesenchymale Zellen [63, 67].

Die Immunreaktion selbst lässt sich generell in zwei Kategorien einteilen. Die zellvermittelte Immunreaktion (Th1) wird durch zytotoxische (Th1-)T-Lymphozyten getragen. Diese sezernieren primär proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die zweite Kategorie ist die humorale Immunreaktion (Th2), vermittelt durch (Th2-)T-Lymphozyten, welche charakteristischerweise antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-6 oder IL-10 freisetzen und eine antikörpervermittelte Abwehrreaktion forcieren [65, 68]. Zwischen beiden Kategorien der Immunreaktionen existieren zahlreiche positive und negative Rückkopplungsmechanismen [63]. In der akuten Phase der Entzündung dominiert die zellvermittelte Reaktion (Th1), während zum Ende einer akuten Entzündung die humorale Reaktion (Th2) überwiegt [68]. Th2-vermittelte Immunreaktionen sind generell inaktiv gegen Tumore und Viren [36].

Das Profil der Zytokine und Chemokine ist wichtig für die Entstehung einer chronischen Entzündung [63]. Eine chronische Antigenexposition könnte einen nicht enden wollenden Kreislauf generieren. Sie führt zu einer Steigerung der Th1-Reaktion. Dies führt zur Aktivierung der humoralen Immunreaktion, welche die zellvermittelte Immunantwort hemmt, die wiederum durch Antigenexposition angetrieben wird, womit sich der Kreis schließt [65].

Histopathologisch findet sich in einer chronischen Entzündung ein Gemisch aus Makrophagen, Lymphozyten, Angiogenese hyperpermeabler Blutgefäße, Fibrose und Nekrose [39]. Dieses Bild charakterisiert das Nebeneinander von anhaltendem Gewebeschaden, Schaden-induzierter zellulärer Proliferation und gewebereparativen Vorgängen [69].

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen physiologischer Wundheilung und dem Entstehen eines, die Proliferation und Invasion maligner Neoplasien unterstützenden, Bindegewebes wurden von Dvorak untersucht. Er bezeichnete Tumoren als „Wunden, die nicht heilen“ [70]. Kennzeichen maligner Neoplasien sind Unabhängigkeit von wachstumshemmenden Signalen, Autarkie in der Produktion von Wachstumssignalen, Umgehen von Apoptosemechanismen, unbegrenztes Replikationspotential, Gewebsinvasion, Metastasierung und anhaltende Angiogenese [71]. Chronische Entzündungen sind in der Lage all diese Charakteristika zu beeinflussen [72].

Vorangehend wurde dargestellt, dass es im Rahmen chronisch inflammatorischer Reaktionen zu einer Mikroumgebung kommt, in der aktivierte Entzündungszellen diverse Zytokine ausschütten. Diese führen letztendlich zu einer gesteigerten Gewebsproliferation und Angiogenese [63, 69]. Des Weiteren werden zellschädigende reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite produziert,

welche unselektiv zu Mutationen und Membranverletzungen führen, was die maligne Transformation begünstigt [39, 63, 64, 66]. Hierdurch entstehende Schäden epithelialer Zellen resultieren in Apoptose und postapoptotischer reaktiver Hyperproliferation. Die gesteigerte Proliferationsrate fördert wiederum die Mutationsrate [73]. Kumulierte Mutationen in regulatorischen Schlüsselgenen führen eventuell zu einer derartigen Veränderung des Zellphänotyps, dass selbst wenn der Auslöser der Entzündung beseitigt wird, eine Transformation zum malignen Phänotyp unaufhaltsam ist [74]. Vielleicht ist zur malignen Transformation sogar eine inflammatorische Umgebung notwendig [39, 65, 70, 75]. Die Entzündungsumgebung wirkt auf Zellen also zum einen initiiierend über eine gesteigerte Mutationsrate bei stetiger Proliferation, zum anderen auch als Promotor durch eine Mikroumgebung reich an Überlebens- und Wachstumsfaktoren [63, 70].

Tumorassoziierte Makrophagen sind ein fester Bestandteil inflammatorischer Infiltrate neoplastischer Gewebe [76]. Obwohl sie primär der zytotoxischen Abwehr von Tumorzellen dienen, sezernieren sie doch eine Reihe potenter angiogener und lymphangiogener Wachstumsfaktoren sowie Zytokine und Proteasen, welche als Mediatoren der neoplastischen Progression vor allem die Invasion und Metastasierung potenzieren [36, 77]. Untersuchungen humaner und muriner Tumoren konnten zeigen, dass das Sekretionsprofil von T-Lymphozyten und tumorassoziierten Makrophagen dem der Th2-Reaktion entspricht [36, 78]. Bestimmte Chemokine sind in der Lage die Immunreaktion derart zu polarisieren [79]. Dies könnte dafür sprechen, dass die chronisch erhöhte Chemokinkonzentration in der Tumormikroumgebung die Zytokinzusammensetzung der extrazellulären Matrix in eine weniger zytotoxische und weniger tumorfeindliche Richtung umzukehren vermag [78].

Hinzu kommt, dass auch Tumorzellen selbst in der Lage sind, Chemokine und proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren zu produzieren und auf diese Weise die inflammatorische Reaktion unterhalten und beeinflussen [36, 77]. Ein vereinfachtes Modell der Kanzerogenese unter Berücksichtigung chronischer Entzündungsreaktionen zeigt Abbildung 4 [64].

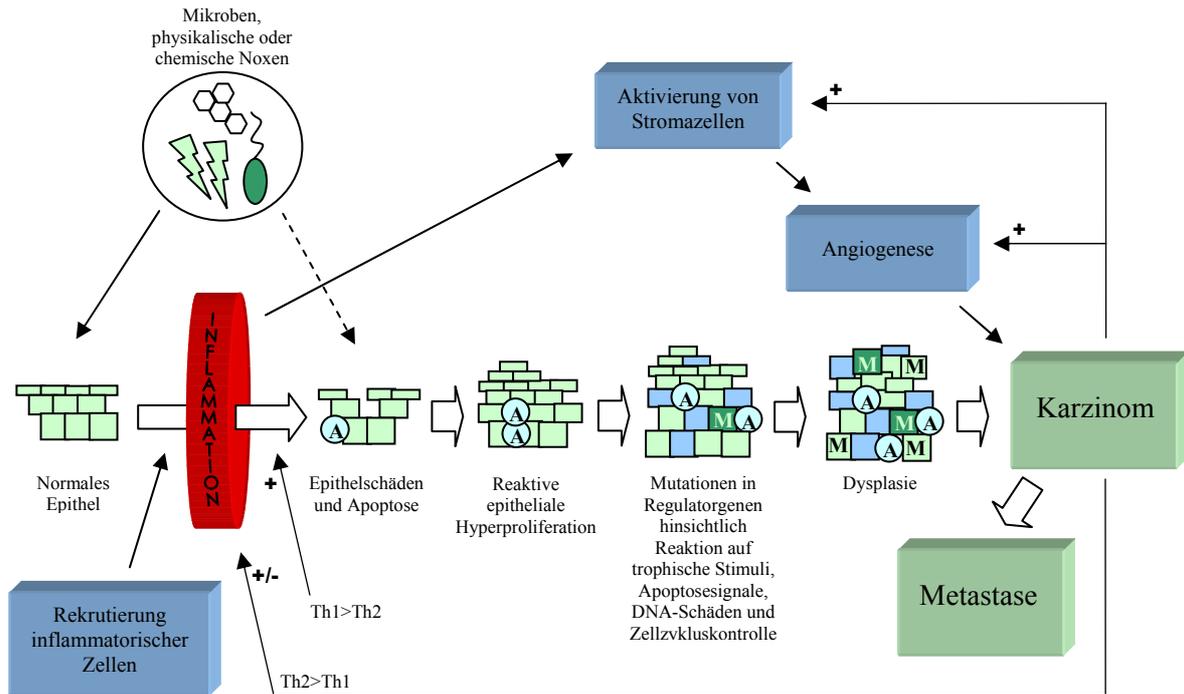


Abbildung 4. Interaktionen epithelialer Zellen mit einer chronischen Entzündungsreaktion während der Mehrstufenkanzerogenese. Persistierende mikrobielle Infektionen (durch Bakterien, Viren, Nematoden etc.), physikalische oder chemische Noxen unterhalten eine chronische Entzündungsreaktion. Verschiedene positive und negative Rückkopplungsmechanismen unterstützen fortwährenden Gewebeschaden sowie, unter diesem Selektionsdruck, das Auftreten von Epithelzellpopulationen mit den notwendigen Überlebensvorteilen für die maligne Transformation (nach Moss und Blaser 2005) [64].

Abschließend sei bemerkt, dass die Zusammenhänge zwischen Krebsentstehung und Entzündung noch nicht hinreichend geklärt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung sind. So existieren Beispiele chronischer Entzündungsreaktionen wie das Krankheitsbild Psoriasis, die statistisch nicht mit einem erhöhten Risiko maligner Entartung einhergehen, trotz analoger immunpathologischer Prozesse [80].

1.3 Gastro- und extraösophageale Refluxerkrankung

1.3.1 Gastroösophagealer Reflux

Definitionsgemäß muss man zwischen dem gastroösophagealen Reflux und der gastroösophagealen Refluxerkrankung unterscheiden. Bei jedem Menschen findet regelmäßig ein sogenannter transienter gastroösophagealer Reflux durch Relaxation des unteren Ösophagussphinkters statt, um Gasen aus dem Magen ein Entweichen zu ermöglichen. Dabei tritt eine gewisse Menge an Mageninhalt in die Speiseröhre [81]. Der Inhalt wird im Anschluss wieder über Peristaltik in den Magen zurückbefördert bzw. die Säure über Neutralisationsmechanismen wie Produktion bikarbonathaltigen Schleimes durch die Mukosa eliminiert [82, 83]. Pathologischen Wert erhält dieser physiologische Prozess durch Entstehen von Epithelschäden und oder klinischen Symptomen [84]. Die klinische Symptomatik äußert sich vor allem im typischen retrosternalem Brennen [85, 86]. Andere Symptome werden auch unter dem Begriff extraösophageale Refluxkrankheit zusammengefasst und bestehen hauptsächlich aus chronischem Husten, Brustschmerz, Heiserkeit, Dysphagie, Laryngitis, Zahnschäden, chronischer Aspiration, chronischer Mittelohrentzündung, Sinusitis, Globusgefühl, Schlafapnoe, nicht-atopischem Asthma und Laryngospasmus [84, 87].

1.3.2 Gastroösophageale Refluxerkrankung

Die gastroösophageale Refluxerkrankung zeigt eine hohe Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung. Hiervon geben ca. 7% mindestens einmal täglich, 14-20% mindestens einmal wöchentlich und ca. 36-44% einmal im Monat retrosternales Brennen an [85, 86]. In zufallsendoskopischen Befunden fanden sich bei ca. 86% der Bevölkerung Zeichen eines gastroösophagealen Refluxes und bei ca. 7-20% der Patienten ebenfalls Zeichen eines laryngopharyngealen Refluxes [88, 89]. 2001 wurde dreimal so oft wie im Jahr 1990 eine gastroösophageale Refluxerkrankung diagnostiziert [90]. Die asiatische Population zeigt im Vergleich zur westlichen Bevölkerung bei ebenfalls steigender Tendenz eine deutlich geringere Rate an erkrankten Patienten. Hier geben nur ca. 3,5% der Menschen an, wöchentlich unter Symptomen wie retrosternalem Brennen zu leiden [91].

Als Risikofaktoren für eine gastroösophageale Refluxerkrankung wurden Adipositas, Rauchen sowie eine gewisse familiäre Assoziation gefunden [92, 93]. Als begünstigend wird die häufige und späte Zunahme großer Mahlzeiten mit hohem Energiegehalt eingestuft [93]. Eine Verstärkung durch Konsum von Kaffee, Schokolade und Alkohol konnte konträrer Weise nicht nachgewiesen werden [93]. In ca. 18-31% der Erkrankten spielen genetische Faktoren eine Rolle. Sowohl bei Patienten mit erkrankten Eltern, als auch bei Patienten mit erkrankten

eineiigen Zwillingen wurde eine höhere Wahrscheinlichkeit, selbst die Krankheit zu entwickeln, festgestellt [92]. Die Infektion mit *Helicobacter pylori* scheint dagegen nur eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung der Refluxerkrankung zu spielen [94].

Die bis dato gültige Einteilung in drei bis vier Stadien der Refluxerkrankung wird in letzter Zeit zunehmend in Frage gestellt [95]. Eingeteilt wurde anhand der endoskopischen Befunde [84]. Das erste Stadium stellt einen ösophagoskopisch unauffälligen Befund dar. Im zweiten Stadium können erosiv-entzündliche Veränderungen der Ösophagusschleimhaut beobachtet werden. Der sogenannte Barrett-Ösophagus mit Zylinderepithelmetaplasie verkörpert das Stadium drei. Die geläufige Theorie war eine über Jahre stattfindende Progredienz der Stadien bis möglicherweise zu Stadium vier, dem Adenokarzinom des Ösophagus. Beobachtet werden konnte eine derartige stadienhafte Progression nur äußerst selten, eine stadienhafte Regression auch unter Therapie praktisch nie [95]. Auch die beobachteten Risiken einer malignen Entartung entsprechen nicht den Stadien. Daher wird zunehmend von einer kategorialen Einteilung der Refluxerkrankung gesprochen [84, 95, 96].

Endoskopisch negative Individuen leiden häufig unter schweren atypischen Symptomen und sprechen nur unzureichend auf die herkömmliche Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren an [97]. Derartige Patienten leiden oft unter einem Reizdarmsyndrom [98]. Die Theorie der Pathogenese in dieser Patientengruppe ist eine Hypersensitivität für einen erhöhten intraösophagealen Druck, für ösophageale Spasmen sowie für ösophageale Salzsäureexposition [97, 99].

Patienten mit endoskopisch nachgewiesener erosiver Ösophagitis geben häufig die typischen Refluxsymptome wie retrosternales Brennen an. Eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren spricht in der Regel gut an und führt meist zur Heilung [100].

Der Barrett-Ösophagus entsteht wahrscheinlich nach chronischer Säureexposition. Klinisch zeigt er aufgrund des insensitivierten geschädigten Epithels tendenziell weniger Symptome [101]. Die Schwere der Entzündungsreaktion ebenso wie die Länge der Metaplasie ist abhängig von der Säureexpositionsdauer [97, 99]. Das Zytokinprofil differiert deutlich von dem der erosiven Ösophagitis, in welchem eher proinflammatorische Signale dominieren [96]. Der Barrett-Ösophagus stellt wahrscheinlich eine differente phänotypische Antwort des Epithels auf die chronische Säureexposition dar [84].

Als pathomorphologische Ursache des gesteigerten Refluxes sind sowohl strukturelle Veränderungen des unteren Ösophagussphinkters, Hiatushernien als auch eine Hypotension besagten Sphinkters in Erwägung zu ziehen [102, 103]. Hierdurch werden das Volumen des transienten Refluxes und somit auch die Säureeliminationszeit erhöht [102]. Dies führt zu einer

Steigerung von Frequenz und Ausmaß der klinischen Symptomatik [104]. Eine Frequenzsteigerung des transienten Refluxes konnte dagegen bei milder bis moderater Symptomatik nicht festgestellt werden [105].

1.3.3 Extraösophageale Refluxerkrankung

Der oben erwähnte Symptomenkomplex der extraösophagealen Refluxerkrankung wird ergänzt durch klinisch-pathologische Befunde wie Glottispolypen, pulmonalen Fibrosen sowie als schwerwiegendste Folge des extraösophagealen Refluxes - das Larynx- oder Pharynxkarzinom [84, 87]. Epidemiologisch gibt es weniger sichere Daten hinsichtlich der Assoziation des extraösophagealen Refluxes mit oben genannten Befunden. Nur groß angelegte Studien können aufgrund des kleinen betroffenen Gesamtpatientenkollektives sichere Daten liefern. Dennoch konnten bei 45% der Asthmapatienten im Vergleich zu 10% der Normalbevölkerung in einer Studie Refluxsymptome nachgewiesen werden und die Chance, ein Asthma bei Vorliegen einer erosiven Ösophagitis zu entwickeln, ist um 50% erhöht [106]. Auch medikamentöse oder chirurgische Refluxtherapie verbessert in 69% der Patienten den chronischen Husten, senkt den Gebrauch von Inhalatoren bei 62% der Patienten und verbessert bei 26% der Patienten die Lungenfunktion [106]. Laryngopharyngealer Reflux konnte bei 10% aller HNO-Patienten sowie bei 50% aller Patienten mit Larynx- oder Stimmveränderungen nachgewiesen werden [107, 108]. Die Patienten zeigen meist keine typischen Mukosaschäden oder Symptome wie retrosternales Brennen [107].

Die Ursache für laryngopharyngealen Reflux ist wahrscheinlich ebenfalls eine Hypotension des unteren Ösophagussphinkters [109]. Zudem ist bei 75% der Patienten die für den Refluxretransport in den Magen verantwortliche primäre Ösophagusperistaltik gestört. Diese zeigt eine geringere Kontraktionsstärke, die Peristaltikwelle verläuft nicht über den gesamten Ösophagus und es kommt nur zu einer inkompletten unteren Sphinkterrelaxation [110]. Hierdurch wird die Säureeliminationszeit verlängert [111]. Beobachtet wurde, dass der afferente Schenkel des Verschlussreflexes des oberen Ösophagussphinkters (M. cricopharyngeus), welcher den laryngopharyngealen Reflux physiologisch verhindert, durch säurebedingte Schäden der Mechano- und Chemorezeptoren unterbrochen wird [112]. Es kommt bei den Patienten zu einer höheren Säurekonzentration im proximalen Ösophagus als im distalen Ösophagus. 30% der Refluxereignisse sind mit Aufstoßen bzw. Rülpsen vergesellschaftet, wobei es zu einer kompletten reflektorischen Relaxation des oberen Ösophagussphinkters kommt [89]. Trotz der geringeren Refluxfrequenz und -dauer, kann es aufgrund des hoch aufsteigenden Mageninhaltes und der hochsensiblen laryngopharyngealen Mukosa zu Schäden in diesem Bereich kommen

[87, 113]. Die Sensibilität der laryngopharyngealen Mukosa äußert sich in einer deutlich im Vergleich zum Ösophagus prolongierten Heilungsdauer von bis zu sechs Monaten [114]. Im Tierversuch konnte allein ein dreimaliger laryngopharyngealer Reflux pro Woche Mukoseschäden verursachen [107, 113]. Schon ein pH-Wert von vier bis sechs ist in der Lage extraösophageale Symptome zu triggern [104]. Das Epithel ist anders als im Ösophagus scheinbar nicht in der Lage, das Isoenzym III der, die protektiven Bikarbonatsalze produzierenden, Karboanhydrase hochzuregulieren, wodurch die Säureeliminationszeit weiter erhöht wird [115]. Das im sauren Milieu aktive Pepsin löst durch Zerstörung des interzellulären Junktionskomplexes Membran- bzw. Epithelschäden aus [116]. Bei chronischem laryngopharyngealen Reflux wurde außerdem eine epitheliale Mindereexpression von E-Cadherin und MUC5AC (Mucin 5 Subtype AC – tracheobronchial mucin) sowie des Salivary Epithelial Growth Factors (SEGF) gefunden. E-Cadherin ist ein membranständiges Glykoprotein, welches wichtig ist für den Zell-Zell-Kontakt und den Zusammenhalt von epithelialen Zellen im Gewebe. Die Expression des Gens MUC5AC führt zur extrazellulären tracheobronchialen Schleimproduktion und der SEGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für das tracheobronchiale Epithel. Eine Mindereexpression führt im Falle des E-Cadherin und MUC5AC zu einer Verminderung der Mukosabarriere aufgrund verminderter Zell-Zell-Verbindung und gesenkter Schleimproduktion [115, 117]. Der Mangel an Salivary Epithelial Growth Factor resultiert in einer möglicherweise verminderten Regenerationsfähigkeit [103]. Klinisch machen diese Umstände eine aggressive Langzeittherapie notwendig [87, 113].

1.4 Rolle der gastro- und extraösophagealen Refluxerkrankung in der Kanzerogenese des oberen Gastrointestinaltraktes

In den letzten Kapiteln wurde dargestellt, inwiefern die Exposition unterschiedlicher Noxen einen Einfluß auf die Krebsentstehung nehmen kann. Verschiedene epidemiologische Studien der letzten Jahre lassen einen Zusammenhang der gastro- und extraösophagealen Refluxkrankheit mit verschiedenen Krebsarten des oberen Gastrointestinaltraktes vermuten. Die entsprechenden Entitäten sowie die Risiken für deren Entstehung werden im Anschluss diskutiert. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.

Tabelle 3. Gegenüberstellung der epidemiologisch gesicherten Haupt- und Nebenrisikofaktoren für die Entitäten Adenokarzinom des Ösophagus und Plattenepithelkarzinom des Larynx.

Entität	Adenokarzinom Ösophagus	Plattenepithelkarzinom Larynx
Hauptrisikofaktor	Männliches Geschlecht	Rauchen
	Rauchen	Chronischer Alkoholkonsum
	Adipositas	Männliches Geschlecht
	Alter (>65 Jahre)	Afroamerikanische Rasse
	Kaukasische Rasse	Extraösophageale Refluxerkrankung
	Gastroösophageale Refluxerkrankung	
Nebenrisikofaktor	Vitamindefizienz	Vitamindefizienz
	Positive Familienanamnese	Positive Familienanamnese
		Berufliche Exposition gegenüber Farben/ Lacken/ Lösungsmitteln
		Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung
		(Chronische Laryngitis)

1.4.1 Adenokarzinom des Ösophagus

Das Ösophaguskarzinom wird histologisch in zwei Typen unterteilt: das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Für die histologischen Typen existieren epidemiologisch

unterschiedliche Risikofaktoren. Die Hauptrisikofaktoren für das Plattenepithelkarzinom werden durch Rauchen, Alkoholkonsum, niedriges Körpergewicht bzw. Unterernährung, niedrigen sozioökonomischen Status und eine positive Familienanamnese repräsentiert. Die des Adenokarzinoms des Ösophagus sind männliches Geschlecht, Rauchen, Adipositas, hohes Alter und Refluxsymptome [59, 118]. In der Literatur existiert eine hohe Evidenz für einen kausalen Zusammenhang für die gastroösophageale Refluxerkrankung und das Adenokarzinom des Ösophagus [59]. Das Plattenepithelkarzinom wird in der Regel nicht mit einer gastro- oder extraösophagealen Refluxerkrankung assoziiert und ist daher kein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit [118]. Ursachen für die fehlende Assoziation des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus mit gastrointestinalem Reflux sind derzeit nicht vollständig geklärt. Gerade vor dem Hintergrund einer epidemiologischen Assoziation des Plattenepithelkarzinoms des Larynx stellt sich die Frage der Unterschiede hinsichtlich Suszeptibilität des Plattenepithels des Larynx und des Plattenepithels des Ösophagus gegenüber Schäden durch chronischen Reflux. Die Ursachen werden in den Refluxschutz- und Abwehrmechanismen des Ösophagus vermutet, welche der Larynx nicht aufweist [107, 119]. Diese bestehen aus dem Tonus des unteren Ösophagussphincters, den peristaltischen Ösophagusbewegungen, der Resistenz der Ösophagealen Mukosa und der säureadaptierten Speicheldrüsensekretion [107, 120-122].

Auch die epidemiologische Entwicklung der Krebssubtypen ist unterschiedlich [118]. Das Adenokarzinom des Ösophagus zeigt in den letzten 20 Jahren einen höheren Anstieg der Inzidenz in der weißen und afroamerikanischen Bevölkerung der USA als alle anderen gastrointestinalen Tumoren während die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms weitestgehend konstant blieb oder leicht sank [118, 123]. Beim Adenokarzinom ist generell ist der jährliche Inzidenzzuwachs in den USA zwischen 1976 und 1987 von 4 auf 10% gestiegen [124]. Bei weißen Männern kam es zu einem Inzidenzanstieg in diesem Zeitraum von über 400%, bei weißen Frauen von über 300% und bei afroamerikanischen Männern von über 100% [125]. 1994 kam es erstmals zu einer höheren Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus als der des Plattenepithelkarzinoms [126]. Viele weitere Studien in den USA und Westeuropa haben diesen starken Anstieg der Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus bestätigt [123, 124, 127-129]. Der Inzidenzanstieg der letzten Jahrzehnte betrifft hauptsächlich die Altersgruppe über 65 [127]. Außerhalb Westeuropas, den USA und Australien ist das Adenokarzinom des Ösophagus relativ selten [130].

Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Adenokarzinoms des Ösophagus sind Das Verhältnis der Inzidenzen weißer Männer zu weißen Frauen beträgt etwa 7:1 und höher [124,

129]. Die Inzidenz in der afroamerikanischen Bevölkerung entspricht etwa 30% der Inzidenz der kaukasischen Bevölkerung [128].

Die gastroösophageale Refluxerkrankung ist epidemiologisch ein Risikofaktor für das Adenokarzinom des Ösophagus [59, 131]. Das Risiko steigt mit der Stärke und der Frequenz der Symptome [59]. Die Wahrscheinlichkeit einer derartigen Krebsentstehung ist bei Refluxerkrankung etwa um das 7,7fache, bei langjährigen schweren Symptomen um das 45,5fache erhöht. Dennoch ist die hohe Prävalenz von >10.000/100.000 Einwohnern der gastroösophagealen Refluxerkrankung der relativ geringen Prävalenz des Adenokarzinoms von 2,3/100.000 Einwohnern kritisch gegenüberzustellen [131].

Eine Barrett-Metaplasie ist in ca. 62% der Fälle nachweisbar und stellt eventuell eine Zwischenstufe zum Karzinom dar [131]. Das Risiko für ein Adenokarzinom des Ösophagus ist bei Vorhandensein eines Barrett-Ösophagus um das 30-125fache höher als in der Normalbevölkerung und liegt bei etwa 0,5-1%/Jahr, wobei der „long-segment“-Barrett-Ösophagus mit einer Länge von mehr als drei Zentimeter ein deutlich höheres Risiko als der „short-segment“-Barrett-Ösophagus aufweist [39, 84, 132]. Hochrisikofaktoren einer Krebsentwicklung aus einer Barrett-Metaplasie sind auch hier männliches Geschlecht, hohes Alter, kaukasische Rasse, positive Raucheranamnese und Langzeitrefluxanamnese [130].

Einen protektiven Effekt auf die Entartung einer Barrett-Metaplasie hat die Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren [133]. So sinkt das Risiko einer Dysplasie unter einer solchen Medikation um ca. 75% [106]. Mehrere Autoren postulierten eine primär chronisch entzündliche Genese des Adenokarzinoms über eine Kaskade von chronischer Ösophagitis über Barrett-Metaplasie und Dysplasie zum Karzinom [39, 134]. Dies wird gestützt durch den Krebsprotektiven Effekt nicht-steroidaler Antirheumatika beim Barrett-Ösophagus [135].

Einige Nahrungsmittel, Spurenelemente und Vitamine scheinen ebenfalls eine protektive Wirkung auszuüben. Hierzu zählen hauptsächlich frische Früchte und Gemüse, Lutein, Niacin, β -Karoten, Folat, Eisen, Zink sowie die Vitamine B6, B12 und C [136, 137]. Die Wirkung basiert auf einem hohen Anteil an Antioxidantien. Diese sind in der Lage DNA-schädigende freie Radikale zu entfernen. Die Risikoreduktion durch derartige Nahrungsmittel scheint bei Rauchern und Patienten mit gastroösophagealer Refluxerkrankung höher zu sein [138].

Die Fünf-Jahresüberlebensraten beider histologischen Typen des Ösophaguskarzinoms sind etwa gleich niedrig bei ca. 16,8%, da in der Regel die Patienten in einem späten Stadium diagnostiziert werden. Die Überlebensraten schwanken ebenfalls nach Alter, Rasse, Geschlecht und Stadium bei Diagnosestellung (schlechter bei Afroamerikanern, Männern, höherem Alter

und Stadium) [139]. Jedoch konnten durch Verbesserungen der endoskopischen Diagnostik eine leichte Steigerung der Überlebensrate in den letzten 20 Jahren erreicht werden [118].

1.4.2 Larynxkarzinom

Die zweite Entität, die mit der gastro- bzw. extraösophagealen Refluxerkrankung epidemiologisch in Verbindung gebracht wird, ist das Larynxkarzinom [107, 140-142]. Circa 1% aller jährlich neu diagnostizierten Krebse der USA betrifft den Larynx. Dies entspricht etwa 11.000 neuen Patienten pro Jahr. Jährlich sterben etwa 4.300 Menschen in den USA am Larynxkarzinom [143, 144]. Kehlkopfkrebs repräsentiert 30-50% aller Krebse des HNO-Bereiches [143]. Zwischen 1953 und 1992 stieg die Inzidenz in Norwegen alle fünf Jahre bei Männern um 17% und bei Frauen um 21% ebenso wie von 1947-1984 in den USA und dies sogar trotz sinkender Raucherzahlen [145]. Das National Cancer Institute der USA berichtet jedoch über sinkende Inzidenzen innerhalb der letzten 15 Jahre. Männer sind viermal häufiger betroffen als Frauen, die kaukasische Rasse nur halb so häufig wie die afroamerikanische [146]. Im Gegensatz zum Ösophaguskarzinom liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate hier bei 61,6%. Das Überleben ist geringer bei Frauen und bei der afroamerikanischen Rasse [139].

Tabakrauch und Alkoholkonsum stellen die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Larynxkarzinoms dar [143, 144, 147, 148]. Zigarettenrauch scheint mit einem durchschnittlich 15-20fach erhöhten Risiko für die laryngeale Krebsentstehung verbunden zu sein. Des Weiteren sind ca. 95% aller Larynxkarzinompatienten Raucher [144, 147, 148]. Obwohl die Inzidenz des Larynxkarzinoms bei Frauen geringer ist als bei Männern, führt ein identischer Zigarettenkonsum weiblicher Individuen zu einer höheren Inzidenz von Kehlkopfkrebs als in der männlichen Bevölkerung [144]. Nach Beenden des Rauchens sinkt über die Jahre das Risiko wieder auf das der Normalbevölkerung. So konnten Studien zeigen, dass sich das Kehlkopfkrebsrisiko nach 16 Jahren Abstinenz vom Rauchen vom 16fachen auf das 2,5fache herabgesenkt hatte [144].

Der Konsum von Alkohol ist mit einem etwa 1,9-3,3fachen Risiko für das Larynxkarzinom assoziiert [147, 148]. Eine Studie konnte den geringeren Effekt chronischen Alkoholkonsums im Vergleich zum Rauchen eindrucksvoll belegen. So kann der Konsum von neun Bier pro Tag das Kehlkopfkrebsrisiko etwa 3-4fach erhöhen, der Konsum von sechs Packungen Zigaretten pro Tag das Risiko jedoch auf ein 80faches der Normalbevölkerung steigern [148].

Andere Risikofaktoren von geringerer Bedeutung für den laryngealen Krebs sind pharyngolaryngeale HPV-Infektionen, verschiedene berufliche Tätigkeiten in Verbindung mit Farben, Lacken und Lösungsmitteln sowie Berufe der Metall-, Kohle-, Gas- und Holzindustrie,

β -Karotendefizienz, Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung sowie in geringerem Ausmaß auch eine erbliche Disposition [46, 149-152].

Trotz der starken Assoziation des Rauchens mit der Larynxkarzinomentstehung und sinkender Raucherzahlen in den letzten Jahren in den westlichen Nationen kam es zu dem oben genannten exorbitanten Anstieg der Inzidenz [145]. Möglicherweise basiert diese Beobachtung auf einer Latenz zwischen Rauchverhalten und Inzidenz der Karzinome. Jedoch führte die epidemiologische Entwicklung zur Suche nach weiteren Risikofaktoren. Mehrere Autoren schlagen die gastroösophageale Refluxerkrankung als unabhängigen Risikofaktor für die Kehlkopfkrebsentstehung vor [141, 142, 144, 153]. Gestützt wird die Hypothese durch die hohe Prävalenz der Refluxerkrankung bei Patienten mit Larynxkarzinom von bis zu 90% [108, 140]. Die gepoolte Odds Ratio für die gastroösophageale Refluxerkrankung und den Kehlkopfkrebs liegt etwa bei 2,37 [154]. Selbst unter Nichtrauchern wurde in einer Studie ein deutlich erhöhtes Risiko der laryngealen Karzinogenese gefunden. Hier klagten etwa 21% nicht rauchender Larynxkarzinompatienten über Reflux-Symptome, wogegen bei Nichtrauchern ohne Larynxkarzinom nur 5% symptomatisch waren [144]. Eine weitere Studie konnte anhand klinischer Symptome und endoskopischem Befund bei nicht rauchenden Larynxkarzinompatienten eine Prävalenz der Refluxerkrankung von etwa 14-47% aufzeigen [153]. Bemerkenswert hinsichtlich der Assoziation der gastro- und der extraösophagealen Refluxerkrankung mit dem Larynxkarzinom ist, dass unter Therapie des Refluxes deutlich weniger Larynxkarzinomrezidive auftreten [153].

Die beiden Hauptrisikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum wirken unabhängig voneinander und dosisabhängig risikosteigernd, in Kombination wahrscheinlich jedoch multiplikativ [155, 156]. Sie beeinflussen jedoch ebenfalls die Entstehung und das Ausmaß des Refluxes. Beide senken den unteren Ösophagussphinkterdruck, verursachen eine veränderte, abnormale Ösophagusmotilität, eine verzögerte Magenentleerung und steigern die Magensaftsekretion [157-159]. Zudem senken sowohl Rauchen als auch Alkohol die zur Neutralisation des Refluxes notwendige Speichelsekretion [160, 161]. Es konnte gezeigt werden, dass die Refluxdauer im distalen und proximalen Ösophagus während des Rauchens deutlich höher war als 48 Stunden nach dem Rauchen bzw. im Vergleich zu Nichtrauchern [159]. Selbst moderater Alkoholkonsum kann die Refluxfrequenz und Refluxdauer erhöhen [158].

Insgesamt steigert Alkoholkonsum das Risiko für eine Refluxerkrankung auf das 1,6fache und Zigarettenkonsum das Risiko um das 1,9fache [162]. Die Refluxerkrankung wirkt in Verbindung mit Zigarettenrauch in der Larynxkarzinomentstehung scheinbar synergistisch [163].

Die Rolle einer chronischen Entzündungsreaktion in der Krebsentstehung des Larynx wird in der Literatur eher kritisch diskutiert. Einzelne Studien konnten eine Verbindung nachweisen. Nur ca. 19% der Larynxkarzinompatienten besitzen vor Entstehung eine positive Anamnese für eine chronische Laryngitis und nur 6-10% der Patienten mit chronischer Laryngitis entwickeln innerhalb eines Fünf-Jahres-Zeitraumes ein Larynxkarzinom [164, 165].

2. Zielstellung

In der Einleitung wurde dargestellt, dass epidemiologisch eine Evidenz für den unabhängigen Risikofaktor gastro- bzw. extraösophagealer Reflux in der Genese sowohl des Adenokarzinoms des Ösophagus als auch des Larynxkarzinoms existiert. Der Mechanismus der Beeinflussung der Kanzerogenese durch den sauren Magensaft ist derzeit nicht geklärt. Generell in Frage kommen hier zum einen ein direkt genotoxischer und zum anderen ein zytotoxischer Effekt. Ebenso wäre es denkbar, dass die chronische Entzündung, resultierend aus dem chronischen Gewebsschaden, ursächlich für die positive Assoziation mit der Kanzerogenese des oberen Gastrointestinaltraktes ist. Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, pH-Wert unabhängig, anhand zellbiologischer Testsysteme das kanzerogene Potential des Magensaftes zu ermitteln sowie zwischen zytotoxischen, möglicherweise Entzündungsreaktionen hervorrufenden, Effekten und Genotoxizität zu differenzieren. Zum Vergleich wurde Salzsäure als wesentlicher Bestandteil des Magensaftes parallel in die Tests eingeschlossen.

Die Art der Zellschädigung spielt eine entscheidende Rolle ob Entzündungsreaktionen entstehen oder nicht. Eine Entzündungsreaktion tritt in der Regel nur als Folge des Zelltodes in Form einer Nekrose auf, da hierbei zytosolische Bestandteile freigesetzt werden, die als Fremdartige vom Immunsystem erkannt werden. Die Zelle schwillt hierbei an und „platzt“ infolge von Membranschädigungen. [166]. Werden die exponierten Zellen apoptotisch, kommt es aufgrund des innerhalb von Vesikeln, also Membranen stattfindenden, aktiven, programmierten Zelltodes nicht zu einer inflammatorischen Reaktion [166, 167]. Prüft man also die Fähigkeit einer Noxe eine Nekrose auszulösen bzw. das Verhältnis der Induktion von Apoptose und Nekrose, kann man deren Potenz, eine Entzündung zu generieren, abschätzen [167]. Das Potential von Magensaft und Salzsäure eine entzündliche Reaktion zu induzieren soll in dieser Arbeit anhand zellbiologischer Testsysteme zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose geprüft werden. Für ein sicheres Ergebnis sind hierfür mehrere verschiedene Tests notwendig [167].

Zytotoxizität kann sowohl in Apoptose als auch in Nekrose münden. Beide Formen des Zelltodes verursachen in der Regel durch Regeneration des geschädigten Gewebes eine erhöhte Teilungsrate [168]. Wie schon dargestellt, entstehen bei DNA-Replikationen trotz multipler Reparaturmechanismen Fehler, welche bei gesteigerter Rate an Replikationen sukzessive häufiger auftreten. Im Gegensatz zu direkt genotoxischen (DNA-reaktiven) Karzinogenen entspricht dieser Schädigungsmechanismus dem, nicht-genotoxischen Karzinogenen [20, 169]. Des Weiteren könnte Apoptose krebsfördernd wirken durch Selektion apoptoseresistenterer Zell-Subpopulationen bei Toxinexposition über längere Zeit [170]. Jedoch auch protektive Effekte

werden durch Apoptose vermittelt wie zum Beispiel durch Zelltod (prä-) neoplastischer Zellen [171]. Ziel der in dieser Arbeit verwendeten zellbiologischen Testsysteme hinsichtlich Nekrose und Apoptose war demnach auch die Untersuchung der Zytotoxizität und die Überprüfung des potentiellen nicht gentoxischen Schädigungsmechanismus des Magensaftes.

Als dritter Schwerpunkt stand konträr zum zytotoxischen Potential die Überprüfung des direkten gentoxischen Potentials der Magensäure im Mittelpunkt der zellbiologischen Untersuchungen. Genereller Fokus lag in den Tests auf dem Einfluss der Konzentration sowie der Expositionszeit der Noxe.

Folgende Hypothesen dienten als Arbeitsgrundlage der Untersuchungen:

- Magensaft wirkt gentoxisch.
- Gentoxische Effekte des Magensaftes sind abhängig von der Expositionszeit.
- Magensaft wirkt kurz- und langfristig exponiert überwiegend nekrotisierend, weniger Apoptose induzierend.
- Die Fähigkeit von Magensaft Apoptose und Nekrose zu induzieren ist expositionszeitabhängig.
- Die Fähigkeit von Magensaft Apoptose und Nekrose zu induzieren ist konzentrationsabhängig.

Ziel der Arbeit war es Grundlagen zu schaffen und als erste Orientierung für größer angelegte Studien mit statistischen Aussagen zu dienen, für die Entwicklung möglicher Screening-Methoden für Risikopatienten, wobei die FACS (Fluorescence activated cell sorting)-basierte Untersuchung der individuellen Zytotoxizität sowie die Untersuchung der Gentoxizität im Mittelpunkt standen. In Toxizitätsuntersuchungen resultieren zum Teil aus den Tests auch bei nicht signifikanten Ergebnissen Verdachtsmomente, die als Basis für gezielte große Studien dienen [172]. Bei Aufdecken unterschiedlicher zytotoxischer Mechanismen, könnten die Ergebnisse auch in neuen interventionellen therapeutischen Ansätzen münden, da die indirekte Kanzerogenität der Zytotoxizität ein langdauernder und potentiell reversibler Prozess ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die in den Tests verwendeten Materialien, Geräte und Verbrauchswaren tabellarisch aufgeführt. Ebenso dargestellt sind die Zusammensetzungen einzelner Gebrauchslösungen.

Substanz	Bezugsquelle
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich München
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich München
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) für neoplastische Leukozyten	Sigma-Aldrich München
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich München
Salzsäure	Merck Darmstadt
Demecolcin	Sigma-Aldrich München
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	ICN Biomedicals Ohio
Trypsin	ICN Biomedicals Ohio
Natriumcitrat	Merck Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich München
<i>Antibiotisch-antimykotische Lösung:</i> 10.000 E/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B	Sigma-Aldrich München
<i>Färbung (Mikrokern-Test):</i> Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung May-Grünwald-Lösung Puffertabletten nach Weise pH 7,2	Merck Darmstadt FLUKA Neu-Ulm Merck Darmstadt
<i>Eisessig:</i> ¼ Essigsäure ¾ Methanol	Merck Darmstadt Merck Darmstadt
<i>PI-Stammlösung Nekrose-Test (FACS):</i> 10 mg Propidiumjodid 25 ml RPMI-Medium ohne FCS, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich München

PI-Nuklei-Lösung Apoptose-Test (FACS):

100 µl	100% Triton-X-100	Sigma-Aldrich München
99,9 ml	Aqua dest.	
1,0 g	Natriumzitat	
5,0 mg	Propidiumjodid	

FITC-Annexin V Kit

BD Biosciences

Propidiumjodid Kit

BD Biosciences

Caspase Assay Kit

Roche Mannheim

Substratgebrauchslösung:

1 ml	Substratstammlösung (500 µM DEVD-R110 in DMSO)
9 ml	Inkubationspuffer

CDD+-Assay Kit

Roche Mannheim

Positivkontrolle:

Flasche 3 Lyophilisat in 450 µl Aqua bidest gelöst,
10 min gründlich gemischt

Immunoreagenz:

1. Anti-Histon-Biotin-Lösung:
Flasche 1 Lyophilisat in 450 µl Aqua bidest gelöst,
10 min gründlich gemischt
2. Anti-DNA-sPOD-Lösung:
Flasche 2 Lyophilisat in 450 µl Aqua bidest gelöst,
10 min gründlich gemischt
3. Inkubationspuffer
(Flasche 4) mit (1) und (2)
im Verhältnis 18:1:1 gemischt

ABTS-Lösung:

Flasche 7, ABTS Substrat-Tabletten
Je 1 Tablette in 5 ml Substrat Puffer (Flasche 6) gelöst

Geräte	Hersteller
pH-Messgerät	WTW Multical pH Meter pH 526
Mikroskop	Nikon EFD-3
Osmolalität-Messgerät	Gonotec Osmomat 030
Casy-1	Schärfe System
FACS-Gerät	BD Facscalibur SNr. E 6363

Verbrauchsware	Hersteller
4-Well-Mikrotiterplatten, unbehandelt	Nunc Langenselbold
Objektträger (sterilisiert im Autoklaven)	Carl Roth Karlsruhe
Kulturflaschen	Nunc Langenselbold
Schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden	Sarstedt Nümbrecht

3.2 Säugerzellkulturen

Sämtliche Zellkulturlinien sind Standardzelllinien und Basis der in der Arbeit verwendeten Standardtestsysteme zur Untersuchung der jeweiligen Mechanismen.

Für die Apoptose- und Nekrosetestung mittels Durchflußzytometrie wurden JURKAT-Zellen und U937-Zellen verwendet. JURKAT-Zellen sind immortalisierte humane T-Lymphozyten und entsprechen humanen T-Zell-Lymphomzellen. JURKAT-Zellen sind verfügbar seit den späten 1970er Jahren und wurden gewonnen aus dem peripheren Blut eines 14 Jahre alten Jungen mit T-Zell-Leukämie [173]. U937-Zellen sind humane Zellen abgeleitet von einem diffusen histiozytischen Lymphom eines 37 Jahre alten Patienten [174]. Die Zellen zeigen eine monozytische bzw. Makrophagen-Charakteristik. Aufgrund der Immortalität und der Wachstumseigenschaften eignen sich diese Zellen für Apoptose- und Nekroseuntersuchungen.

Als Testobjekte für den Mikrokerntest diente die permanente Zelllinie V79 (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*). Die Zellkultur V79 findet seit 1981 Platz bei Gentoxizitätsuntersuchungen, ist ausreichend validiert und wurde nach Standardprotokollen entwickelt. In den letzten 20 Jahren wurde die Zelllinie in hunderten von Studien zur Gentoxizität verwendet [149].

Die JURKAT-Zellen und die U937-Zellen wurden in 20 ml Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) bei 37,0 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 10 ml 0,584 g/l L-Glutamin pro Liter Kulturmedium kultiviert.

Die V79-Zellen wurden in 25-cm²-Zellkulturflaschen bei 37,0 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte in je 5ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 0,584 g/l L-Glutamin, 10 Einheiten/l Penicillin, 10 µg/l Streptomycin und 25 pg/l Amphotericin B kultiviert.

Für die permanente Stammhaltung wurden Monolayerkulturen durch Trypsinieren (25%ige Trypsinlösung) passagiert. Die durchschnittliche Passage der Zelllinien vor dem Einsetzen derselben betrug 8-10.

3.3 Testsubstanzen

Als Testsubstanz diente in den zellbiologischen Testsystemen zum einen eine Konzentrationsreihe 0,1 N Salzsäure im Sinne des Hauptbestandteils der Noxe Magensaft. Die Salzsäure diente in allen Tests dem Vergleich und zum Einordnen der Toxizität des Säurebestandteils und anderer potentieller Inhaltstoffe des Magensaftes selbst. Um eine subletale bzw. subkritische Konzentration der Säure bzw. des Magensaftes im Vorfeld der Testreihen zu ermitteln, welche sich weitestgehend pH-neutral verhält, wurde ein entsprechender Vorversuch durchgeführt.

Desweiteren diente eine Konzentrationsreihe gastroscopisch gewonnener kompletter Patienten-Magensäfte als Testmaterial für die zellbiologischen Untersuchungen.

3.3.1 Vorversuch zur Bestimmung der Pufferwirkung des Kulturmediums

Um einen physiologischen Testbereich hinsichtlich der pH-Wert-Änderung nach Säureapplikation zu ermitteln, wurde die Pufferwirkung des Kulturmediums getestet. Hierdurch konnte eine subkritische bzw. subletale Säurekonzentration bzw. -menge für die Anwendung in den nachfolgenden Testsystemen abgeleitet werden.

Unter Zugabe definierter Volumina (100 µl, 200 µl, 250 µl, 500 µl) verdünnter Salzsäure wurde mit pH 3 bzw. mit pH 2 die entsprechende Änderung des pH-Wertes sowie der Osmolalität in fünf Milliliter Kulturmedium gemessen. Als Negativkontrolle diente destilliertes Wasser. Anhand des Ergebnisses wurden die entsprechenden Testvolumina sowie der Test-pH-Wert der Noxe Salzsäure festgelegt.

3.3.2 Gewinnung der Magensaftproben

Jeweils 5ml des Nüchtern-Magensaftes wurden während einer Routine-Gastroskopie im Zentrum für Innere Medizin der Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von fünf sonst gesunden mindestens sechs Stunden nüchternen Patienten entnommen und direkt im Anschluss bei -20,0 °C eingefroren. Vor Applikation der Proben im entsprechenden Testsystem wurden diese im Wasserbad bei 37,0 °C aufgetaut und erwärmt. Die Einschlusskriterien für die Patienten war ein Alter zwischen 18 und 65 Jahren ohne Präferenz des Geschlechtes.

Ausschlusskriterien waren:

- regelmäßiger Alkohol-, Drogen- oder Nikotinkonsum
- chronisch entzündliche Erkrankungen und Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes
- Krebserkrankungen oder entsprechende Radio- oder Chemotherapie

- Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten oder immunsuppressiven Medikamenten (Kortikoide etc., nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente [NSAID])
- Einnahme von Magen-protectiven Medikamenten wie Säuresekretonshemmer, Antazida
- multimorbide Patienten, mit Zuordnung der ASA Risikogruppe größer als II [175]
- erhöhtes Blutungsrisiko (z.B. Antikoagulanzenherapie)
- Infektionskrankheiten, wie HIV, Hepatitis B, C , Tuberkulose oder CMV
- antibiotische Therapie

Die Forderungen der Deklaration von Helsinki [176] wurden erfüllt.

3.4 Biologische Testsysteme

Im nachfolgenden werden die unterschiedlichen Testsysteme zur Bestimmung der unterschiedlichen Aspekte der Apoptose und Nekrose im Sinne der Zytotoxizität sowie das Testsystem zur Bestimmung der Genotoxizität der Magensäure vorgestellt. Eine Übersicht der Testsysteme und deren Zielparameter zeigt Abbildung 5.

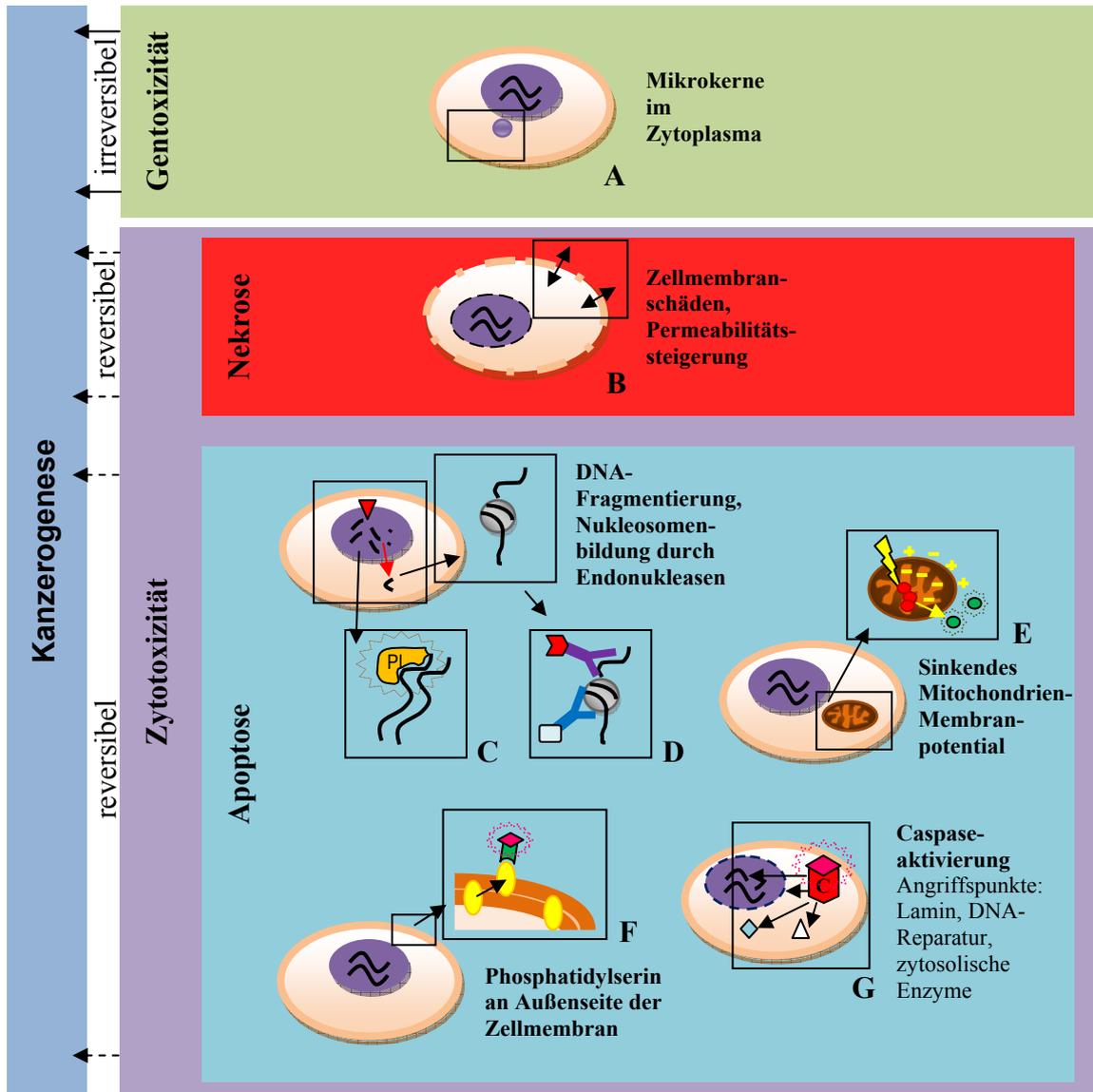


Abbildung 5. Übersicht der Prinzipien der angewendeten Testverfahren. Genotoxizität als irreversibler Prozess führt zu Kanzerogenese, abgebildet durch Nachweis von Mikrokerne (A). Potentiell reversible Mechanismen der Zytotoxizität bestehen aus Nekrose und Apoptose. Testverfahren (Propidiumjodid- und Annexin-Test) nutzen die Permeabilität der Zell- und Kernmembranen bei nekrotisierenden Prozessen zum Anfärben zytosolischer (Membran-) Bestandteile oder von DNA zur Diskrimination von nichtpermeablen Membranen apoptotischer Zellen (B). Testsysteme, basierend auf Prozessen während der Apoptosekaskade (C-G) zu deren Nachweis, sind: Färbung mit der nichtnukleosomalen DNA mit Propidiumjodid (C) ELISA mittels Antikörperbindung an Nukleosomen (D); Fluoreszenzfarbstoffaktivitätsänderung durch sinkendes Mitochondrienmembranpotential (E); Annexinfärbung von bei Apoptose auch an der

Zellmembranaußenseite exprimierten Membranproteinen (F); Fluoreszenzfarbstoffmarkierung aktivierter Caspasen (G).

3.4.1 Durchflußzytometrische Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Propidiumjodid

3.4.1.1 Grundlagen

Die Durchflußzytometrie, oft auch FACS (Fluorescence activated cell sorting) genannt, ist ein Verfahren sowohl zum Sortieren von Zellen anhand bestimmter Charakteristika als auch zum Messen von Zellveränderungen, -zahlen und oder Zelleigenschaften. Das Prinzip beruht auf der Messung der emittierten optischen Signale seitens der Zelle, während diese einen Laserstrahl passiert. Die Passage der in Lösung befindlichen Zellen geschieht hierbei einzeln, aufgesaugt durch eine Kapillare. Hierdurch wird entweder Streulicht oder werden Fluoreszenzimpulse bei entsprechend Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Antikörper-Färbungen der Zelle emittiert. Das Streulicht gibt Auskunft über Zellgröße, Struktur der Zellmembran sowie potentiell auch über intrazelluläre Bestandteile. Als Parameter dienen hierbei zum Einen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter - FSC), hervorgerufen durch Lichtbeugung, welches die Zellgröße charakterisiert, und zum Anderen das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter – SSC), hervorgerufen durch Lichtbrechung als Maß für die Granularität der Zelle (Größe und Struktur des Zellkerns) [177].

Zur Bestimmung der Nekroserate wird der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid verwendet, welcher mit der DNA interkaliert, somit fest an diese bindet und hierbei sein Absorptionsmaximum sowie sein Emissionsmaximum verschiebt sowie seine fluoreszierenden Eigenschaften verzwanzig- bis -dreißigfach. Der Farbstoff kann durch perforierte Zellmembranen nekrotischer Zellen, jedoch nicht durch die intakte Zellmembran lebender Zellen diffundieren (B und C in Abbildung 5) [178]. Die nekrotischen Zellen lassen sich anhand eines Fluoreszenz-Peaks im FACS erkennen und messen.

Zur Bestimmung der Apoptoserate mittels FACS nutzt man die Möglichkeit den DNA-Gehalt von gezielt lysierten Zellen mit Propidiumjodid darzustellen (C in Abbildung 5). Hieraus ergibt sich ein DNA-Gehaltverteilungsprofil, welches den Phasen des Zellzyklus zuzuordnen ist. Zellen in der G₀/G₁-Phase weisen einen diploiden Chromosomensatz auf und bilden einen Peak. Zellen in der G₂/M-Phase mit einem doppelten diploiden Satz vor Teilung bilden einen zweiten Peak mit entsprechend mehr DNA. Die in Synthesephase befindlichen Zellen findet man in einem kleinen Plateau zwischen den Peaks wieder. Ein Zeichen der Apoptose ist die DNA-Fragmentierung in oligonukleosomale Einheiten durch spezifische Endonukleasen (C in

Abbildung 5). Diese Nukleosomen können den Zellkern verlassen und damit geht DNA für den Nachweis verloren. Im Histogramm erscheinen apoptotische lysierte Zellen in einem sogenannten Sub-G1-Peak, welcher messbar ist. Zellen, welche in der späten S-Phase apoptotisch werden fallen hierbei eventuell in den G1-Peak und werden nicht detektiert [179]. Die Lyse der Zellmembranen erfolgte vor Färben mit Propidiumjodid mittels Triton-X (Octoxinol-9). Durch Einsatz eines geeigneten Lysepuffers ist hierbei keine RNase erforderlich.

3.4.1.2 Ablauf

Vor Testung wurden JURKAT-Zellen mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Milliliter RPMI-Medium nach Messung der Zellzahl mittels des Zellzahlgerätes Casy-1 eingestellt. Die Zellen wurden daraufhin auf eine 24-Well-Platte mit je 1 ml/well beschickt und gefolgt von einem Sedimentationsprozess für eine Stunde. Vor Zugabe der Testlösungen wurde ein dem Testvolumen entsprechendes Volumen an Medium entnommen. Die Testlösungen wurden zugesetzt und die Zellen über 24 Stunden inkubiert. Als Testlösung fungierten die fünf Magensäfte und 0,1 N Salzsäure in den Konzentrationen 1:10, 1:20 und 1:40 Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium. Als Positivkontrollen wurden die Zellen mit Staurosporin, einem toxischen kompetitiven Inhibitor an der Adenosintriphosphat(ATP)-Bindungsstelle von Proteinkinasen (aus *Streptomyces staurosporeus*), im Testansatz in den Endkonzentrationen von 0,125 und 0,06 μM belastet [180]. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS fand eine erneute Resuspension in RPMI-Medium ohne Phenolrot sowie ohne FCS statt. Die so entstandene Zellsuspension wurde auf zwei FACS-Röhrchen zu je 500 μl verteilt jeweils für Nekrose- und Apoptosemessung. Die Messendpunkte beider Tests waren entweder 80 Sekunden Messdauer oder 10.000 gezählte Zellen. Eine Doppelbestimmung des Tests wurden zur Verifikation der Ergebnisse durchgeführt.

3.4.1.3 Bestimmung der Nekroserate

Zu jedem der ‚Nekrose‘-Röhrchen mit 500 μl Zellsuspension wurden 10 μl isotonischer PI-Stammlösung gegeben und vor Messung am FACS-Gerät zum Einwirken 15 min in Dunkelheit gelassen. Mittels des Gerätes wurde der prozentuale Anteil PI-positiver Zellen gemessen. Für jede Zelllinie muss bei erstmaliger Anwendung entsprechend ihrer Zellgröße und Granularität eine optimale Einstellung der Verstärker des Flowzytometers erfolgen und als „Instrument setting“ für diese Zelllinie gespeichert werden. Daher erfolgte die Messung am FACS-Gerät mit der optimalen Einstellung für JURKAT-Zellen. Die aus der Doppelbestimmung resultierenden

Raten wurden gemittelt. Die Nekroseraten der Magensaft- und Salzsäurekonzentrationen wurden im Anschluss mit der der Negativkontrolle verglichen.

3.4.1.4 Bestimmung der Apoptoserate

Die ‚Apoptose‘-Röhrchen wurden bei 1200rpm und Zimmertemperatur abzentrifugiert und in jeweils 500 µl PI-Nuklei-Lösung resuspendiert. Vor Messung im FACS-Gerät fand eine 60 minütige Inkubation in Dunkelheit bei 4°C statt. In der Auswertung wurden alle Zellen, welche einen geringeren als einen diploiden DNA-Gehalt (Sub-G1-Peak) hatten als apoptotisch gewertet. Von der gemessenen Rate der apoptotischen Zellen wurde vor statistischer Auswertung die gemessene Rate nekrotischer Zellen abgezogen. Die aus der Doppelbestimmung resultierenden Raten wurden gemittelt. Die Apoptoseraten der Magensaft- und Salzsäurekonzentrationen wurden im Anschluss mit der der Negativkontrolle verglichen.

3.4.2 Bestimmung der Apoptoserate mittels (Mitochondrien-)Membranpotential-Test

3.4.2.1 Grundlagen

Das mitochondriale Membranpotential ist bei nichtapoptotischen Zellen relativ konstant bei etwa -170 bis -220 mV. Während der Apoptose kommt es zunehmend zu einem Absinken des mitochondrialen Membranpotentials (E in Abbildung 5) [181]. Der Test basiert auf einem Fluoreszenzfarbstoff (JC-1) der seit 1937 bekannt ist [182]. JC-1 aggregiert bei normalem Potential in den Mitochondrien und liegt potentialabhängig bei Abfällen des Potentials zunehmend in Form von Monomeren vor und gelangt ins Zytoplasma. Hierbei wird das Fluoreszenzfarbspektrum von rot (Farbstoffaggregate) nach grün (Farbstoffmonomere) verschoben, was wiederum fluorometrisch messbar ist (E in Abbildung 5). Mittels Propidiumjodid können auch hierbei lebende von toten Zellen unterschieden werden (B in Abbildung 5) [183].

3.4.2.2 Ablauf

Für diesen Test wurden die U937-Zellen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingesetzt (Verdünnung nach Messung mittels Casy-1). Hiervon wurden jeweils 2ml in eine 24-Well-Platte eingesät, welche über 24 und über 48 Stunden mit den Magensaftproben der Endkonzentration der Konzentration 1:10 belastet wurden. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium. Nach Inkubation und kurzem Abzentrifugieren erfolgte das Aufnehmen der Zellen in PBS mit einer Konzentration der Zellen von 1×10^6 /ml. Im Anschluss wurden 40 µl 3 µM DiOC₆-Lösung auf 1ml Suspensat zugegeben und für 15 Minuten bei 37,0 °C inkubiert. Pro Milliliter erfolgte nun

die Zugabe von 40 µl PI-Lösung und die 10 minütige Inkubation im Dunkeln. Direkt nach Inkubation wurden die Lösungen im FACS gemessen (FACS-„Instrument setting“: optimale Einstellung für U937-Zellen). Die Messendpunkte waren entweder 80 Sekunden Messdauer oder 10.000 gezählte Zellen.

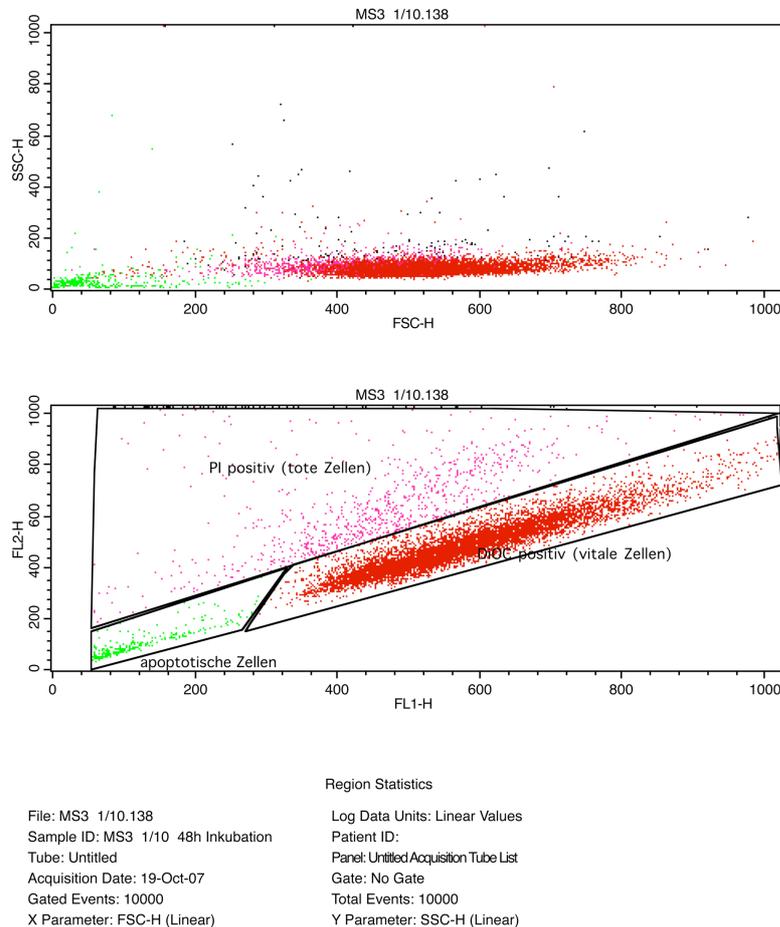


Abbildung 5. Darstellung der Auswertungsmaske nach FACS-Messung im Forward-Scatter-Diagramm (beispielhaft Magensaftprobe 3, 48h Belastung) zur Diskriminierung zwischen vitalen (DiOC₆ positiv), apoptotischen und nekrotischen Zellen (Propidiumjodid (PI) positiv).

3.4.2.3 Auswertung

Mittels Maske im Forward-Scatter Diagramm (siehe Abbildung 5, Software „Cell Quest 3.3“ [FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA]) wurde die Gruppe Propidiumjodid-positiver Zellen von den DiOC₆-positiven Zellen und von den avitalen farbstoffnegativen Zellen differenziert und gemessen. Hieraus resultiert der prozentuale Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen. Die Nekrose- und Apoptoseraten der Magensäfte ebenso wie die Zahl vitaler Zellen wurden mit denen der Negativkontrolle sowie interindividuell verglichen. Zudem wurde der Effekt der Belastungszeit auf die Faktoren Nekrose, Apoptose und Vitalität untersucht.

3.4.3 Bestimmung von Apoptose und Nekrose mittels Annexin-FITC (Fluoresceinisothiocyanat) und Propidiumjodidmarkierung

3.4.3.1 Grundlagen

Dieser Test basiert auf der Beobachtung, dass während der Apoptose bestimmte Phospholipide, die normalerweise nur auf der Innenseite der asymmetrisch organisierten Zytoplasmamembran lokalisiert sind, zunehmend auch der Außenseite derselben zu finden sind [184]. Das Protein und Antikoagulant Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin, welches zu dieser Gruppe der Phospholipide zählt. Fluorescein-konjugiertes Annexin V wird für fluoreszenz basierte Analyseverfahren (FACS etc.) zur Apoptosebestimmung verwendet (F in Abbildung 5). Problem des Verfahrens ist, dass auch nekrotische Zellen aufgrund der Zytolyse durch Annexin V angefärbt werden. Daher muss eine Parallelfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt werden, welches aufgrund der Membranimpermeabilität nur die DNA nekrotischer Zellen markiert (B und C in Abbildung 5) [185].

3.4.3.2 Ablauf

Dieser Test erfolgte ebenfalls mit Doppelbestimmung. Für den Test wurden die JURKAT-Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingesetzt (Bestimmung mittels Casy-1). 24-Well-Platten wurden mit jeweils 1 ml Zellsuspension pro Well beschickt und im Anschluss mit der Salzsäurekonzentrationsreihe (0,1 N Salzsäure mit den Endkonzentrationen 1:10, 1:20, 1:40) bzw. den Magensaftkonzentrationen (Endkonzentrationen 1:10, 1:20 und 1:40) belastet und zwei Stunden bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Als Positivkontrolle diente wiederum Staurosporin in vier verschiedenen Konzentrationen (Positivkontrolle 1: 6 $\mu\text{mol/l}$, Positivkontrolle 2: 4 $\mu\text{mol/l}$, Positivkontrolle 3: 2 $\mu\text{mol/l}$ und Positivkontrolle 4: 1 $\mu\text{mol/l}$), als Negativkontrolle Zellkulturmedium. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen transferiert, zentrifugiert (800 Umdrehungen pro Minute, fünf Minuten), zweimal mit PBS gewaschen und in je 1 ml ‚1x Binding Buffer‘ (zehnfach verdünnt aus dem Kit) aufgenommen. Aus diesen Röhrchen wurden jeweils 100 μl entnommen und auf zwei neue FACS-Röhrchen übertragen. Je ein Röhrchen der Positivkontrollen diente der Propidiumjodid-Kompensation (Zugabe von 5 μl PI) und eines der Annexin V-Kompensation (Zugabe von 5 μl Annexin V). Eine Negativkontrolle wurde ohne PI- oder Annexin V-Färbung getestet. Zu den Testansätzen zum Apoptose-Test wurden 5 μl PI und 5 μl Annexin V zugegeben. Die Röhrchen wurden sanft geschüttelt und 15 min in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von jeweils 400 μl ‚1x Binding Buffer‘ sowie daran anschließend die Messung am FACS (FACS-„Instrument setting“: optimale Einstellung für JURKAT-Zellen).

Da dieser Test mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen arbeitet ist eine „Compensation“ erforderlich. Diese dient dazu, Überlagerungen der beiden Farbstoffe durch geeignete Geräteinstellung auszuschließen. Sie erfolgt mit Zellen, die nur mit einem der Farbstoffe markiert wurden und diese werden in getrennten Quadranten des Auswertedokumentes, das mit der Software „Cellquest“ des Flowzytometers angelegt wurde dargestellt. Die Messendpunkte waren entweder 80 Sekunden Messdauer oder 10.000 gezählte Zellen.

3.4.3.3 Auswertung

Mit der Software „Cell Quest 3.3“ (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) lässt sich eine Quadrantenstatistik erstellen die es ermöglicht, die prozentualen Anteile unmarkierter und damit vitaler Zellen, FITC-Annexin V markierter und damit apoptotischer Zellen und Propidiumjodid und FITC-Annexin V markierter und damit nekrotischer Zellen direkt abzulesen. Die aus der doppelten Testansatzbestimmung resultierenden Raten wurden gemittelt. Die Nekrose- und Apoptoseraten der Magensaftkonzentrationsreihe und der Salzsäurekonzentrationsreihe wurden im Anschluss mit denen der Negativkontrolle verglichen, um eventuelle Verdachtsmomente hinsichtlich des entsprechenden Schädigungspotentials aufzudecken.

3.4.4 Bestimmung von Apoptose durch den Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen (Cell Death Detection ELISA^{plus}[CDD⁺])

3.4.4.1 Grundlagen

Als ein weiterer Test zum Nachweis apoptotischer Wirkungen wurde ein ELISA, der „Cell Death Detection ELISA Plus (CDD⁺ ELISA)“ als Testkit der Firma Roche eingesetzt. Dieser Assay arbeitet mit Antikörpern zum Nachweis der für den apoptotischen Zelltod charakteristischen Fragmente der genomischen DNA, die im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod vor einer Desintegration der Zellmembran gebildet werden. Diese Fragmente entstehen durch die systematische enzymatische Spaltung der DNA und werden als Nukleosomen bezeichnet. Nukleosomen sind DNA-Histon-Komplexe, die der angewendete ELISA durch den Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern, gegen DNA und Histone, nachweist. Dabei ist Anti-Histon an Biotin und Anti-DNA an Peroxydase gekoppelt (D in Abbildung 5). Durch Einsatz eines Peroxydasesubstrates erfolgt die Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes in Abhängigkeit von der Nukleosomenkonzentration. Das resultierende farbige Reaktionsprodukt wird photometrisch gemessen. Dieser ELISA ist ein qualitativer Nachweis und es wird ein Index aus den Extinktionen substanzbelasteter und unbelasteter oder mit dem Lösungsmittel belasteter

Zellen gebildet. Wenn dieser Index ein Vielfaches dessen der unbelasteten Zellen ist, zeigt er an, dass die Substanz apoptotisch wirksam ist. Zum Vergleich wird stets eine Kit-interne Positivkontrolle mitgeführt [186].

3.4.4.2 Ablauf

Für den CDD+-Test wurden U937-Zellen bei einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingesetzt (Verdünnung nach Messung mittels Casy-1). Für den ELISA wurden 100 µl Zellsuspension und 100 µl Medium (Negativkontrolle) bzw. Probenverdünnung (Magensäure bzw. 0,1 N Salzsäure mit den jeweiligen Endkonzentrationen 1:10, 1:20 und 1:40 sowie 0,1 N Salzsäure mit einer Endkonzentration von 1:5) pro Well eingesetzt. Auch in diesem Test erfolgten Doppelbestimmungen. Die Platte wurde drei Stunden bei 37,0 °C und 5% Kohlendioxid inkubiert und nach Inkubation 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl Lysispuffer pro Well aus dem Testkit resuspendiert und die Zellen 30 min bei 37,0 °C lysiert. Nach Lyse erfolgte nochmalige Zentrifugation der Mikrotiterplatte bei 250 x g. Die im Testkit enthaltenen Streptavidin-coateden Streifen der Mikrotiterplatte wurden in den Rahmen eingesetzt und anschließend 20 µl der Überstände der Zelllysate aus der Rundbodenmikrotiterplatte in die coateden Wells übertragen. Als Positivkontrolle diente die im Testkit dafür vorgesehene Lösung, pipettiert in zwei Wells. Zusätzlich fungierten 20 µl des Inkubationspuffers der Backgroundbestimmung in zwei coateden Wells. Nach Zugabe von je 80 µl Immunoreagenz (frisch angesetzt vor Einsatz) und Abkleben der Mikrotiterplatten wurden diese zwei Stunden bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die Platten wurden ausgeklopft, zweimal mit 250-300 µl Inkubationspuffer gespült sowie nochmals gründlich ausgeklopft. Im nächsten Schritt erfolgte das Einpipettieren von je 100 µl ATBS-Lösung in jedes Well und die Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur für 10 bis 20 min. Die Messung mittels ELISA Readers wurde bei 405 nm gegen ATBS-Lösung als Blank (Background) gemessen. Als Referenzwellenlänge fungierten 490 nm.

3.4.4.3 Auswertung

Von den pro Ansatz gemessenen drei Negativkontrollen wurde der Mittelwert der optischen Dichte im jeweiligen Ansatz dem Apoptoseindex ‚1‘ gleichgesetzt. Der Apoptoseindex der jeweiligen Testsubstanz ergab sich durch in Relation setzen der optischen Dichte der Testsubstanz/Positivkontrolle zu der des Mittelwertes der Negativkontrollen. Die resultierenden Indices der Doppelbestimmung wurden gemittelt. Die Apoptoseindices sowie die mittleren

optischen Dichten der Testsubstanzkonzentrationen wurden im Anschluss mit den Werten der Negativkontrolle verglichen.

3.4.5 Bestimmung von Apoptose durch fluorimetrische Messung der apoptoseinduzierten Caspaseaktivitäten

3.4.5.1 Grundlagen

Der Caspase-Test beruht auf dem Nachweis der Aktivitäten spezifischer Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Caspasen (Cystein-Aspartat-Proteasen) sind Schlüsselenzyme der Apoptose. Ihr Substrat besteht aus verschiedenen Proteinen wie Lamin (Protein der Kernmembran), DNase-Inhibitoren (ICAD – Inhibitor of Caspase Activated DNase), DNA-Proteinkinasen, welche wie DNA-Reparatur aktivieren, sowie diverse zytosolische Enzyme. Die Aktivierung der Caspasen, von denen verschiedene Unterenzyme existieren, stellen eine Einbahnstraße in Richtung Apoptose dar [187]. Durch Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Substrate mit einer Caspase-spezifischen Bindungsstelle, können die Farbstoffe bei Caspaseaktivität aktiviert sowie darüber indirekt über Caspaseaktivität auch die Apoptoserate bestimmt werden [188]. Die zweite Möglichkeit der Apoptosebestimmung besteht über Bindung von Fluorescein gekoppelten Caspase-Inhibitoren an das aktive Zentrum der Caspasen in-situ. Die so markierten Zellen können wiederum mittels Fluorometrie, FACS oder Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden (G in Abbildung 5) [189].

3.4.5.2 Ablauf

Die Untersuchungen mit dem fluorimetrischen „Homogeneous Caspases Assay“ von Roche wurden jeweils mit Doppelbestimmungen durchgeführt. Verwendet wurden schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit transparentem Boden. Als Negativkontrolle diente 100 µl RPMI-Medium als Positivkontrolle die 1:10 verdünnte Gebrauchslösung aus dem Set sowie für die Eichkurve R110 in den Konzentrationen 2 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,125 µM und 0,0625 µM in RPMI-Medium. 50 µl der Probenkonzentrationen (Magensäure bzw. 0,1 N Salzsäure mit den jeweiligen Endkonzentrationen 1:10, 1:20 und 1:40 sowie 0,1 N Salzsäure mit einer Endkonzentration von 1:5) wurden pro Well einpipettiert sowie jeweils 50 µl der U937-Zellsuspension (8×10^5 Zellen/ml, verdünnt nach Zellzahlbestimmung mittels Casy-1) zugegeben und anschließend für drei Stunden zur Apoptoseinduktion bei 37,0 °C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nun wurden Negativ- und Positivkontrolle sowie die Eichkurve einpipettiert. Im nächsten Schritt wurden in jedes Well 100 µl Substratgebrauchslösung (Caspasesubstrat) gegeben und sofort danach die Eichkurve im Fluoreszenzreader gemessen (Exzitation: 499 nm; Emission: 521 nm). Daran anschließend wurde die Platte nochmals bei 37,0 °C und 5%

Kohlendioxid bei 1,5 Stunden inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Proben bestückten und der Negativ- und Positivkontrollen-Wells bei oben genannten Parametern im Fluoreszenzreader.

3.4.5.3 Auswertung

Anhand der gemessenen Fluoreszenz der Eichkurvenverdünnung wurde für jeden Versuchsansatz die entsprechende Eichkurvengerade bestimmt. Anhand der Eichkurvengerade wurden die entsprechenden Messwerte der Fluoreszenzmessung in nmol/l Rhodamin umgerechnet. Die Rhodaminkonzentration der Negativkontrolle des jeweiligen Messansatzes wurde einem Apoptoseindex von ‚1‘ gleichgesetzt. Durch ins Verhältnis setzen der Rhodaminkonzentration der Negativkontrolle mit denen der Positivkontrolle und der Testsubstanzen wurde deren Apoptoseindex ermittelt. Die Apoptoseindices ebenso wie die gemessenen Rhodaminkonzentrationen der Magensäure- und Salzsäurekonzentrationsreihe wurden im Anschluss mit den Werten der Negativkontrolle verglichen.

3.4.6 Bestimmung der Gentoxizität (Mikrokern-Test)

3.4.6.1 Grundlagen

Als Mikrokerne (MK) wird von einer Kernmembran umgebenes Chromatin im Zytoplasma bezeichnet, welches sich vom Hauptkern abgesondert hat. Im lichtmikroskopischen Bild erscheinen sie als Strukturen, die kleiner als der Hauptkern sind (maximal ein Drittel des Hauptkerndurchmessers). Die Farbintensität entspricht der des Hauptkerns. Ein nach Mutagenbelastung folgender Verlust von Chromatin aus dem Hauptkern führt zur Entstehung von Mikrokernen (A in Abbildung 5) [190]. Dieses Chromatin besteht entweder aus ganzen Chromosomen, welche durch Verzögerung der Anaphase nicht in die Tochterzelle integriert worden sind, oder aus Chromosomenfragmenten nach einem Bruchereignis. Aus ganzen Chromosomen bestehende Mikrokerne (Zentromer-positiv, größere MK) deuten auf einen aneuploidogenen gentoxischen Effekt hin. Bei Mikrokernen, die dagegen Chromosomenfragmente enthalten (zentromer-negativ, kleinere MK), liegt ein klastogener gentoxischer Effekt zugrunde [191]. Folge dessen werden Mikrokerne als Indikator für eine Genomschädigung verwendet. Sie stellen ein quantitatives Maß für chromosomale Schäden dar, da strukturelle Chromosomenabberationen wie Inversion oder Translokation zu keiner Fragmentierung des Chromatins führen.

Der MK-Test wird seit 1937 als Indikator für gentoxische Exposition eingesetzt [192]. In den 50er Jahren haben Evans et al. bei Strahlen-exponierten Pflanzenzellen eine erhöhte Anzahl an Mikrokernen festgestellt [193]. Heddle und Mitarbeiter führten Ende der 70er Jahre In-vivo-

Versuche an Knochenmarkzellen von Kleinsäugetieren durch [194]. Klinische Studien beweisen eine Reproduzierbarkeit der Methode anhand verschiedener zytologischer Präparate, wie z.B. der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes, des Intestinaltraktes, der Lunge sowie der Lympho- und Erythrozyten [195].

3.4.6.2 Ablauf

Nach Abtrypsinieren in logarithmischer Wachstumsphase sowie Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Casy-1 wurden die V79-Zellen in einer Zellzahl von 50000 Zellen in 5 ml Kulturmedium (für V79-Zellen) aufgenommen, auf die sich in 4-Well-Dish-Platten befindenden Objektträger überführt sowie vier Stunden unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium entfernt und jeweils das Kulturmedium-Salzsäure-Gemisch (1 ml der 0,1 N Salzsäure, 4 ml Kulturmedium für V79-Zellen) bzw. das Kulturmedium-Magensaftprobengemisch (0,1 ml der Magensaftproben der Patienten und 4,9 ml Zellkulturmedium für V79-Zellen) hinzugegeben. Als Negativkontrolle fungierte Kulturmedium (für V79-Zellen) und als Positivkontrolle ein Kulturmedium-Demecolcin-Gemisch (4 ml Kulturmedium für V79-Zellen, 1 ml Demecolcin). Die Proben wurden 24 Stunden inkubiert. Um den Effekt der Belastungszeit zu untersuchen, wurde im Falle der Salzsäureansätze ein Teil der Zellen alle 24 Stunden vereinzelt, auf neue Objektträger umgesetzt und erneut mit Salzsäure-Kulturmedium-Gemisch inkubiert, sodass täglich bis nach dem achten Umsetzen Zellen für den MK-Test der Präparation zugeführt werden konnten. Im Falle der Magensäfte war dies aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge der Magensäfte nicht möglich. Vor der Präparation wurden die Zellen auf Wachstum und Morphologie untersucht. Anschließend werden die Objektträger 10 min mit Hypotonielösung (je Probe 5 ml 1,5%ige Natriumzitratlösung) bei 37,0 °C behandelt. Dann erfolgte die Fixation der Zellen mittels Methanol-Eisessig-Gemisch (Mischverhältnis Methanol:Eisessig = 3:1; je Probe 5 ml Gemisch) für 2x10 Minuten bei 4,0 °C. Nach Lufttrocknung erfolgte die Färbung der Proben mit Giemsa- und May-Grünwald-Lösung. Hierzu wurden die Objektträger für 3 min im Färbebad mit May-Grünwaldlösung und 20 min mit Giemsa Lösung behandelt. Zwischen den Färbevorgängen wurden die Proben mit Weise-Puffer gespült (Abbildung 7)

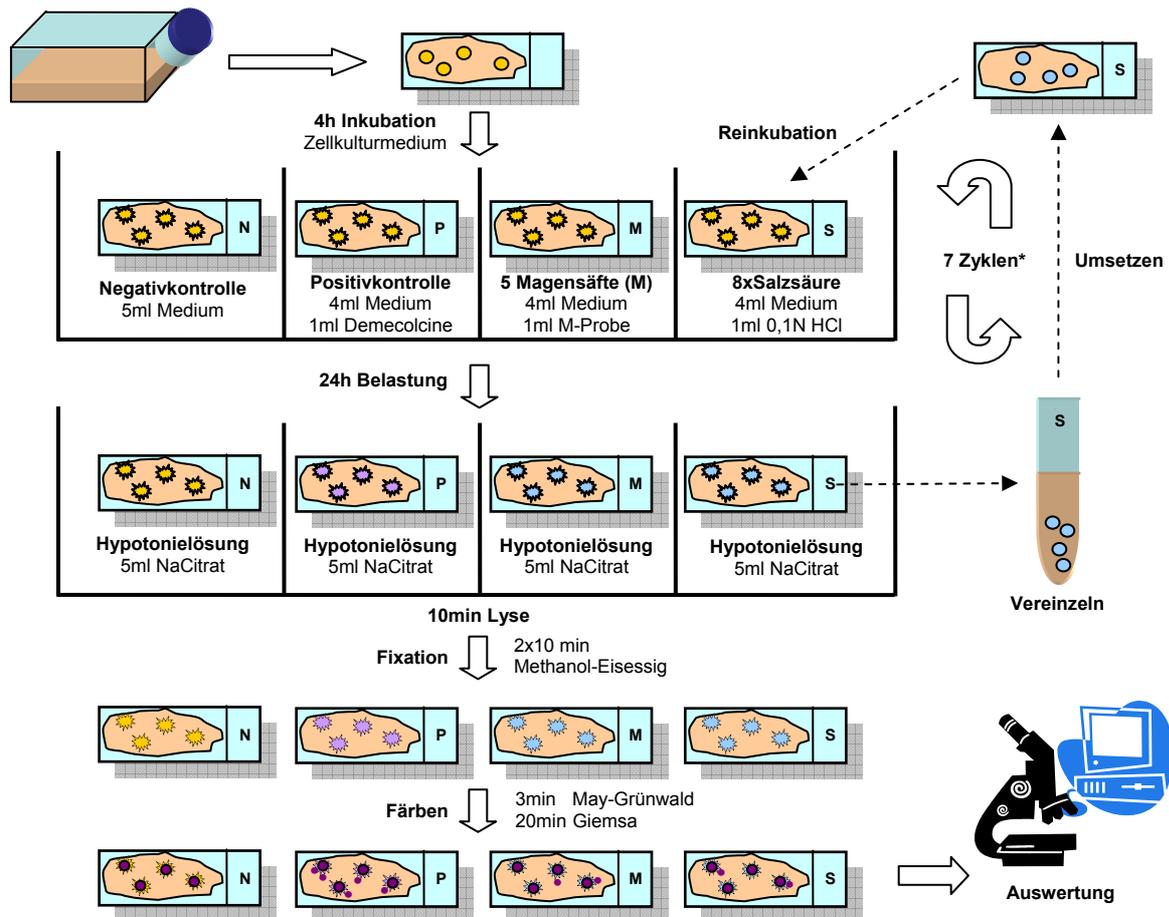


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Mikrokerntests. N – Negativkontrolle, P – Positivkontrolle, M – Magensaftprobe, S – Säureprobe. *Vor Applikation der Hypotonielösung - Vereinzeln der Zellen, Umsetzen und Reinkubation gefolgt von erneuter 24 Stunden-Belastung. Nach jedem Zyklus Fortsetzen des Tests mit einer Probe bis zur Auswertung.

3.4.6.3 Auswertung

Je Säurekonzentration und Inkubationszeit wurden 1.000 Zellen mittels 10x40 Objektiv (400fache Vergrößerung) im Lichtmikroskop analysiert [196]. Als Mikrokernel wurde ein klar abgrenzbares Partikel im Zytoplasma mit einer Größe von weniger als einem Drittel des Hauptzellkerns definiert. Mikrokerne, welche sich mit dem Hauptzellkern überlappten wurden nicht einbezogen. Jeder Mikrokernel wurde einzeln fokussiert, um Verwechslungen mit Schmutz- bzw. Farbpartikeln, welche Reflektionen aufweisen, auszuschließen. In Mitose befindliche Zellen wurden nicht gezählt. Die Färbung des Mikrokernel durfte höchstens so stark wie der Hauptkern sein. Registriert wurden sowohl Zahl der Zellen mit Mikrokerneln als auch die jeweilige Zahl der Mikrokerneln pro Zelle (Tabelle 4) [197].

Tabelle 4. Zusammenfassung der Auswertekriterien für den Mikrokerntest mit Mikroskop (400fache Vergrößerung mittels 10x40 Objektiv, 1.000 Zellen).

Methodik	Fokussieren jeder einzelnen Zelle
	Zahl der Zellen mit Mikrokern
	Mikrokerne pro Zelle mit Mikrokern

Einschlusskriterien	klar abgrenzbarer Partikel im Zytoplasma
	kleiner 1/3 des Hauptkern
	Stärke der Färbung maximal die des Hauptkerns

Ausschlusskriterien	Überlappen mit dem Hauptkern
	Reflektionen (typisch für Verschmutzung/Farbpartikel)
	Mitotische Zellen

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Statistik-Software-Paketes SPSS Version 14.01 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse wurde nach entsprechender Beratung mit und unter Anleitung durch eine Mitarbeiterin des Institutes für medizinische Statistik der Charité Berlin durchgeführt.

Zur Testung der Einzelhypothesen erfolgte die statistische Untersuchung zweiseitig mittels univariatem allgemeinem linearen Modell. Die Auswertung des Mikrokerntests erfolgte im Einzelvergleich der Proben mittels Fisher's Exact-Test. Die Vergleiche der optischen Dichten bei CDD⁺- und Rhodaminkonzentrationen beim Caspase-Assay erfolgten mittels zweiseitigem t-Test nach Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Bei Vergleichen von mehr als zwei Stichproben wurde mittels des posthoc Tests nach Bonferroni korrigiert. Alle Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Testergebnisse des Vorversuchs

Zu prüfen war, welche Volumenzugabe von Säure zu Kulturmedium eine deutliche pH-Verschiebung bzw. Änderung der Osmolalität des Kulturmediums verursacht, was den Versuchsablauf, ebenso wie die Wachstumsbedingungen der Zellen negativ beeinflusst hätte. Darüberhinaus war nicht die Erfassung pH-Wert abhängiger Veränderungen, sondern die Erfassung direkter konzentrationsabhängiger zyto- oder gentoxischer Effekte der Inhaltstoffe Ziel der Arbeit.

Tabellen 5a-c. Ergebnisse des Vorversuchs zur Pufferwirkung des Zellkulturmediums

Testsubstanz: destilliertes Wasser (Kontrolle)		
5ml Kulturmedium plus Testvolumen	pH-Wert	Osmolalität [Osmol/kg]
100µl	7,89	0,315
200µl	7,88	0,310
250µl	7,88	0,290
500µl	7,88	0,288

Testsubstanz: verdünnte Salzsäure (pH-Wert 2)		
5ml Kulturmedium plus Testvolumen	pH-Wert	Osmolalität [Osmol/kg]
100µl	7,83	0,307
200µl	7,79	0,303
250µl	7,75	0,298
500µl	7,65	0,286

Testsubstanz: verdünnte Salzsäure (pH-Wert 3)		
5ml Kulturmedium plus Testvolumen	pH-Wert	Osmolalität [Osmol/kg]
100µl	7,88	0,308
200µl	7,88	0,292
250µl	7,88	0,295
500µl	7,87	0,283

Ziel der Voruntersuchung war somit eine subletale bzw. subkritische Säurekonzentration im Zellkulturmedium zu ermitteln. Die Testergebnisse zeigten, dass es zu keiner wesentlichen Änderung von pH-Wert und Osmolalität nach Zugabe der entsprechenden Volumina Säure in dem geplanten Testvolumen kam (siehe Tabellen 5a-c).

4.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung

Im nachfolgenden werden die Ergebnisse der Tests auf Zytotoxizität dargestellt. Je nach Testsystem resultieren hierbei Apoptoseraten oder -indices, zum Teil im Vergleich zu Nekroseraten. Unterschiedliche, möglicherweise Konzentrations- oder Expositionszeitabhängige Teile der Apoptosekaskade werden hierbei beleuchtet (siehe Abbildung 5). Standardabweichungen der Magensäfte resultieren aus der Testung aller fünf Magensaftproben (jeweils Doppelbestimmung pro Probe und Test). Die Darstellung der Salzsäuretestergebnisse zum Vergleich erfolgt als Mittelwert der Testdurchläufe (jeweils Doppelbestimmung pro Test).

4.2.1 Testergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Zytotoxizität mittels Propidiumjodid

Prüfgegenstand dieses Tests war der Nachweis von Zytotoxizität und im Speziellen die differentielle Betrachtung von Apoptose- und Nekroseraten nach Belastung mit einer Salzsäurekonzentrationsreihe sowie einer Magensaftkonzentrationsreihe.

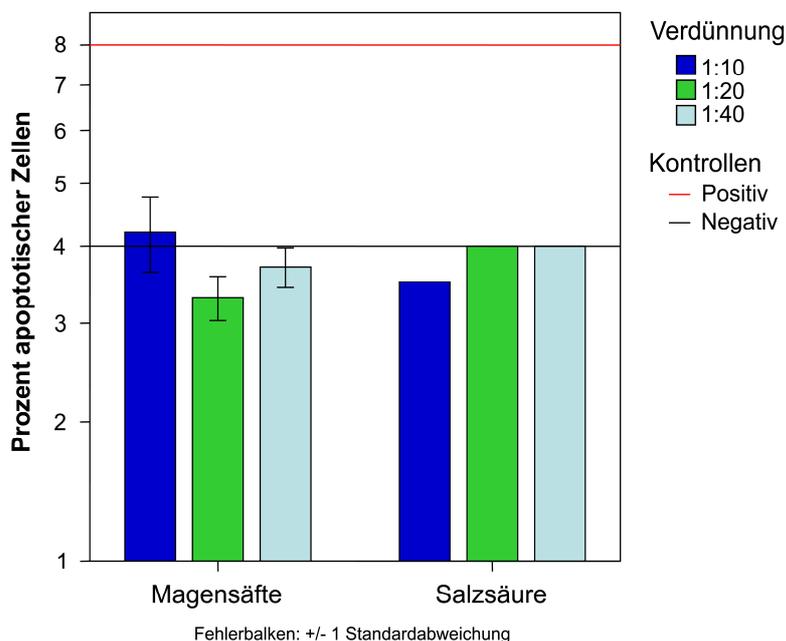


Abbildung 8a. Darstellung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen mittels Propidiumjodid (FACS-Messung, logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle (schwarze Linie). Darstellung der Positivkontrolle 0,06 μM Staurosporin (rote Linie). Nicht dargestellt ist Positivkontrolle 0,125 μM Staurosporin (22% apoptotische Zellen).

Der Test fungierte zur Einschätzung eines längerfristigen Belastungszeitraums und weist DNA-Verluste durch Nukleosomenbildung und deren Verlust ins Zytoplasma als Bestandteil der Apoptosekaskade nach (siehe C in Abbildung 5).

Als erste Arbeitshypothese für diesen Test diente der Ansatz, dass Magensaft im Vergleich zur Negativkontrolle nach der Inkubationszeit von 24 Stunden in der Lage ist, in JURKAT-Zellen Nekrose oder Apoptose zu induzieren. Getestet wurden hierbei die jeweiligen Konzentrationen der Magensäfte gegen die Negativkontrolle.

Die Exposition gegenüber der Magensaftkonzentration 1:10 resultierte in einer im Mittel erhöhten Apoptoserate und die Exposition gegenüber der Magensaftkonzentration 1:40 resultierte in einer im Mittel erhöhten Nekroserate im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildungen 8a, b).

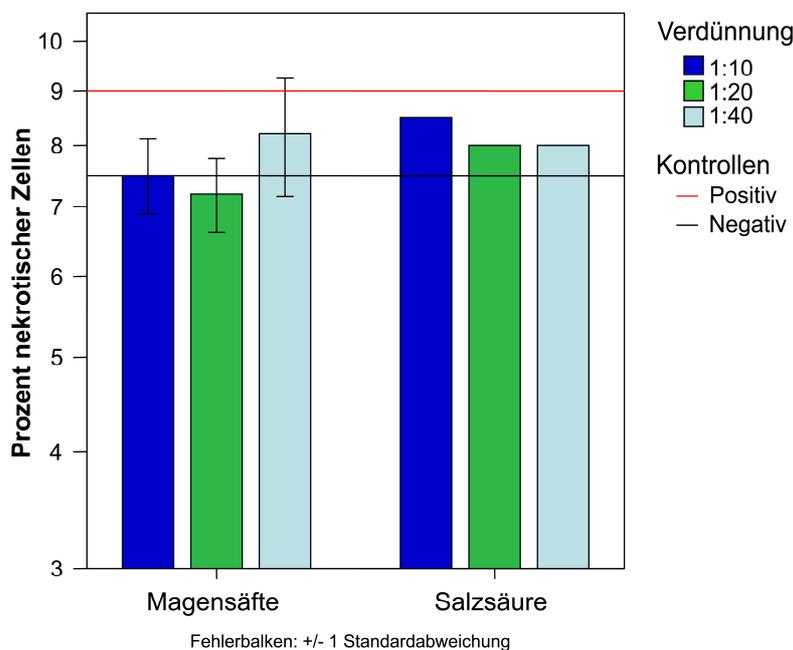


Abbildung 8b. Darstellung des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen mittels Propidiumjodid (FACS-Messung, logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle (schwarze Linie). Darstellung der Positivkontrolle 0,06 μ M Staurosporin (rote Linie). Nicht dargestellt ist Positivkontrolle 0,125 μ M Staurosporin (19% nekrotische Zellen).

Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied der Apoptose- und Nekroseraten im Vergleich zur Negativkontrolle.

Bei Untersuchung der Nekroserate zeigte sich eine relativ starke interindividuelle Schwankung der Nekroseraten. So erreicht die Exposition einzelner Magensäfte das Niveau der

Positivkontrolle, sodass ein Verdachtsmoment der Fähigkeit zur Nekroseinduktion zu äußern ist (Tabellen 6a, b).

Tabelle 6a: Konzentrationsabhängige Apoptoserate in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Magensaftproben mittels Propidiumjodid und FACS. *P*-Werte sind im Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle dargestellt. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (0,125 μ M Staurosporin): 22,00%; Positiv 2 (0,06 μ M Staurosporin): 8,00%.

Probenkonzentration	Prozent apoptotischer Zellen (Magensäfte)						<i>p</i> -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	4,20\pm0,57	4,5	4,0	3,5	5,0	4,0	0,765
1:20	3,30\pm0,27	3,5	3,0	3,0	3,5	3,5	0,080
1:40	3,70\pm0,27	3,5	4,0	3,5	3,5	4,0	0,374
Negativkontrolle	4,0						

Tabelle 6b: Konzentrationsabhängige Nekroserate in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Magensaftproben mittels Propidiumjodid und FACS. *P*-Werte sind im Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle dargestellt. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (0,125 μ M Staurosporin): 19,00%; Positiv 2 (0,06 μ M Staurosporin): 9,00%.

Probenkonzentration	Prozent Nekrotischer Zellen (Magensäfte)						<i>p</i> -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	7,50\pm0,61	7,5	7,5	7,0	8,5	7,0	1,000
1:20	7,20\pm0,57	7,0	7,5	8,0	6,5	7,0	0,656
1:40	8,20\pm1,04	9,0	9,5	8,0	7,0	7,5	0,571
Negativkontrolle	7,5						

Die interindividuellen Unterschiede der einzelnen Magensaftproben waren jedoch nicht signifikant hinsichtlich der Apoptose- ($p=0,670$) und Nekroserate ($p=0,611$). Die Arbeitshypothese, dass die Konzentration des Magensaftes einen Einfluss auf die Rate apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen hat sollte ebenfalls geprüft werden. Die Analyse sowohl

hinsichtlich Apoptoserate ($p=0,353$) als auch Nekroserate ($p=0,146$) ergab keinen signifikanten Effekt der Konzentration auf das entsprechende Testergebnis. Die entsprechenden Messergebnisse sind in den Tabellen 6a, b sowie in den Abbildungen 8a und b dargestellt.

Tabelle 6c: Konzentrationsabhängige Apoptoserate der 0,1 N Salzsäurekonzentrationsreihe in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle mittels Propidiumjodid und FACS. Darstellung der p -Werte im Kreuzvergleich. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (0,125 μM Staurosporin): 22,00%; Positiv 2 (0,06 μM Staurosporin): 8,00%.

Salzsäurekonzentration	Prozent apoptotischer Zellen	p -Wert
1:10	3,5	0,852
1:20	4,0	1,000
1:40	4,0	1,000
Negativkontrolle	4,0	

Tabelle 6d: Konzentrationsabhängige Nekroserate der 0,1N Salzsäurekonzentrationsreihe in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle mittels Propidiumjodid und FACS. Darstellung der p -Werte im Kreuzvergleich. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (0,125 μM Staurosporin): 19,00%; Positiv 2 (0,06 μM Staurosporin): 9,00%.

Salzsäurekonzentration	Prozent nekrotischer Zellen	p -Wert
1:10	8,5	0,794
1:20	8,0	0,895
1:40	8,0	0,895
Negativkontrolle	7,5	

Das zweite Ziel des Tests war die Einstufung des Nekrose- und Apoptosepotentials der Konzentrationsreihe der 0,1 N Salzsäure im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Arbeitshypothese war hier, dass die unterschiedlichen Konzentrationen der Salzsäure als

wesentlicher Bestandteil des Magensaftes in der Lage sind, nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich zur Negativkontrolle Apoptose bzw. Nekrose hervorzurufen. Dies war in Hinsicht auf die Nekroserate, nicht jedoch hinsichtlich der Apoptoserate der Fall, sodass hier ein Verdachtsmoment der Nekroseinduktionsfähigkeit besteht. Die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant (Tabellen 6c und d, Abbildungen 8a und b). Sowohl Apoptose- als auch Nekroserate der Salzsäure waren nicht konzentrationsabhängig (jeweils $p=1,000$).

4.2.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mittels des Mitochondrien-Membranpotential-Tests (MMP+-Test)

Dieser Test diente ähnlich dem mittels Propidiumjodid der Ermittlung der Zytotoxizität der Magensäfte. Auch im MMP+-Test wurde zwischen Nekrose- und Apoptoseraten in Relation zu vitalen Zellen differiert. Basis des Testsystems ist das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials während der Apoptosekaskade (siehe E in Abbildung 5). Zudem wurde der Test mit zwei Inkubationszeiten durchgeführt um unter anderem den Einfluss der Belastungszeit auf Nekrose und Apoptose zu überprüfen. Die Zeiträume bezogen sich hierbei auf eine längerfristige Belastung. Getestet wurde der Einfluss der Magensäfte.

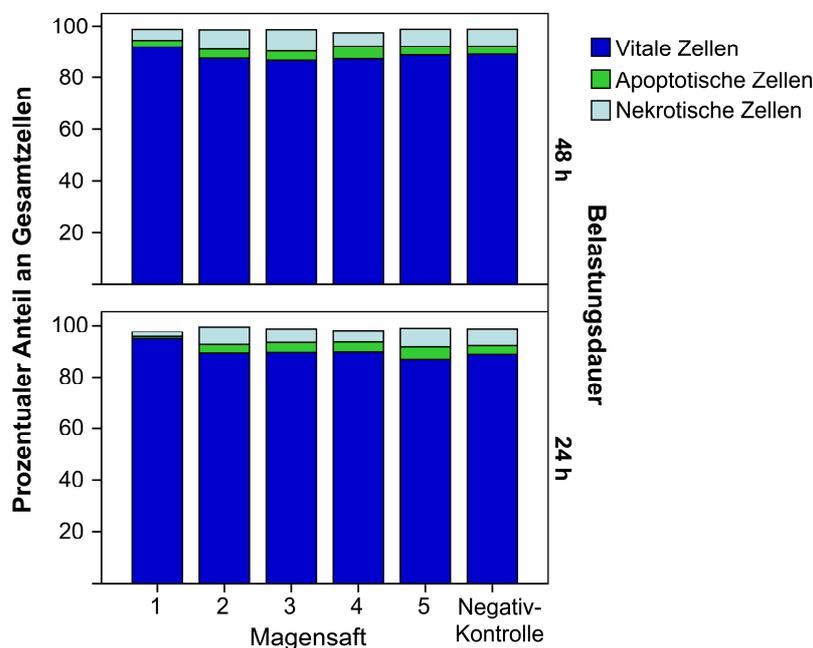


Abbildung 9. Darstellung des Anteils vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Mitochondrien-Membranpotential-Test nach 24 und 48 Stunden Belastung mit den Magensaftproben 1-5 im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle.

Die erste Arbeitshypothese für Anwendung des MMP+-Tests war, dass die fünf Magensäfte einen höheren Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen induzieren im Vergleich zur

Negativkontrolle im Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 sowie in Abbildung 9 dargestellt. Im Mittel war die Apoptoserate, welche durch die Magensäfte nach 24 Stunden Inkubationszeit induziert wurde, geringer als die der Negativkontrolle, während nach selbigem Zeitraum die Zahl nekrotischer Zellen im Mittel im Vergleich zur Negativkontrolle höher war. Nach 48 Stunden glichen sich die Apoptose- und Nekroseraten wieder denen der Negativkontrolle an. Es besteht ein Verdachtsmoment, dass die Exposition von Magensaft das Verhältnis von Apoptose und Nekrose im Belastungszeitraum von 24 Stunden zugunsten der Nekrose verschiebt. Statistisch getestet, konnte nach beiden Inkubationszeiträumen weder eine signifikant erhöhte Apoptose- noch Nekroserate im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Prozentualer Teil apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen (Mittelwert±Standardabweichung) nach 24 und 48 Stunden Belastung durch die Magensäfte im MMP-Test. Dargestellt sind die *p*-Werte im Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle.

Prozent der Gesamtzellpopulation		Magensäfte						Negativkontrolle	<i>p</i> -Wert
		Gesamt	1	2	3	4	5		
24h Belastung	Apoptotische Zellen	3,34±1,58	0,8	3,2	3,8	3,8	5,1	6,5	0,983
	Nekrotische Zellen	5,12±2,13	1,9	6,8	5,3	4,4	7,2	3,3	0,585
	Vitale Zellen	90,14±2,96	94,9	89,5	89,7	89,9	86,7	89,0	0,743
48h Belastung	Apoptotische Zellen	3,58±0,81	2,6	3,5	3,6	4,9	3,4	3,2	0,663
	Nekrotische Zellen	6,46±1,68	4,3	7,6	8,4	5,3	6,7	6,7	0,915
	Vitale Zellen	88,46±2,06	91,9	87,5	86,7	87,4	88,8	89,0	0,809

Daher wurde der Einfluss der Belastungszeit auf die Veränderung der Apoptose- bzw. Nekrose- und Vitalitätsraten untersucht. Als Hypothese fungierte die Annahme eines inkrementellen Teils apoptotischer oder nekrotischer Zellen über die Belastungszeit. Der Zeitraum der Belastung zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Vitalitätsrate ($p=0,689$), Apoptose- ($p=0,962$) oder Nekroserate ($p=0,624$). Innerhalb der Probengruppe fanden sich keine signifikanten interindividuellen Unterschiede zwischen den Magensäften (Vitalität $p=0,891$; Apoptose $p=0,821$; Nekrose $p=0,607$).

4.2.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstestung mittels Annexin-FITC-Tests

Prüfgegenstand dieses Tests war ebenfalls die Zytotoxizitätstestung. Anhand von während der Apoptosekaskade an der Zellmembranaußenseite exprimierten Phospholipiden, welche sonst nur an der zytosolischen Seite nachweisbar sind, fand der Apoptosenachweis sowie die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nach Belastung mit einer Salzsäurekonzentrationsreihe sowie einer Magensaftkonzentrationsreihe statt (siehe F in Abbildung 5). Der Test fungierte als Prüfsystem für Kurzzeitbelastung. Als erste Arbeitshypothese für diesen Test diente der Ansatz, dass Magensaft sowohl eine gesteigerte Nekrose als auch eine gesteigerte Apoptose im Vergleich zur Negativkontrolle in den JURKAT-Zellen nach zwei Stunden Belastung induziert. Getestet wurden hierbei die jeweiligen Konzentrationen der Magensäfte gegen die Negativkontrolle.

Die Exposition gegenüber 1:10 und 1:20 verdünnten Magensäften resultierte in einer im Mittel erhöhten Apoptoserate, sodass hier ein Verdachtsmoment der Erhöhung der Apoptoserate besteht. Die Exposition gegenüber keiner der Konzentrationen der Magensäfte resultierte in einer erhöhten Nekroserate im Vergleich zur Negativkontrolle.

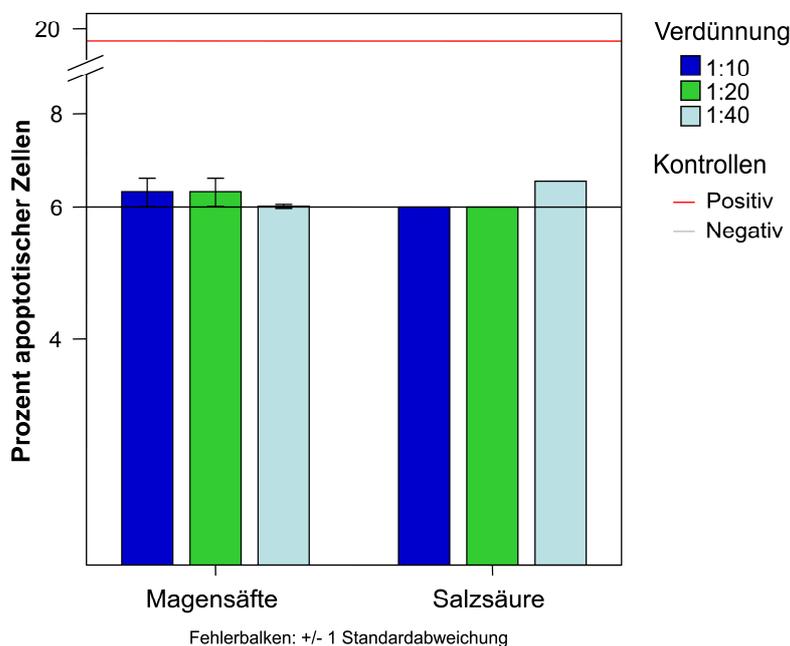


Abbildung 10a. Darstellung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen mittels Annexin-FITC-Test (FACS-Messung, logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle (schwarze Linie). Positivkontrolle mit 1 μ M Staurosporin dargestellt durch rote Linie. Nicht dargestellt sind die Positivkontrollen mit 6 μ M (49% apoptotische Zellen), 4 μ M (47% apoptotische Zellen) und 2 μ M (43% apoptotische Zellen) Staurosporin.

Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied der Apoptose- und Nekroseraten im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 10a, b; Tabellen 8a, b).

Die Arbeitshypothese, dass die Konzentration des Magensaftes einen Einfluss auf die Rate apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen hat sollte ebenfalls geprüft werden. Die Analyse hinsichtlich Apoptoserate ($p=0,042$) jedoch nicht hinsichtlich der Nekroserate ($p=0,638$) ergab einen signifikanten Effekt der Konzentration auf das entsprechende Testergebnis. Die einzelnen Magensaftproben zeigten hierbei keine interindividuellen signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Apoptose- ($p=0,260$) und Nekroserate ($p=0,342$).

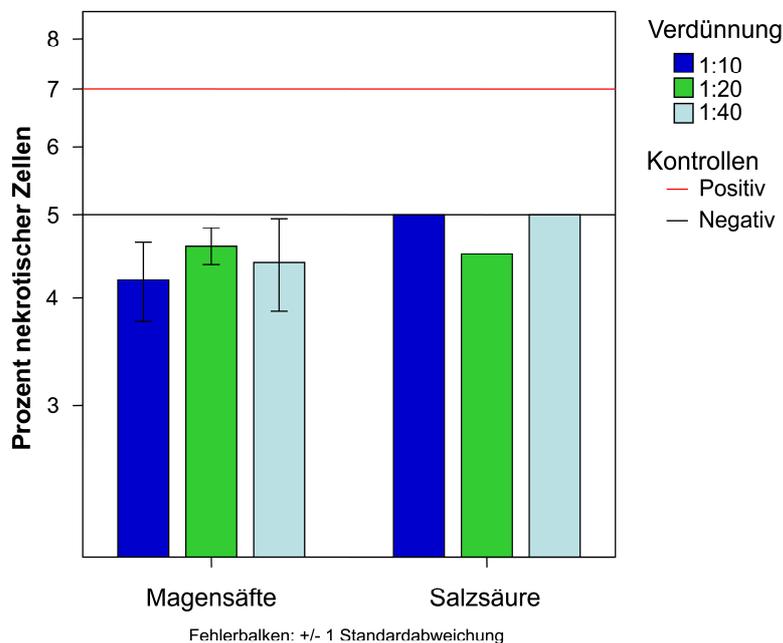


Abbildung 9b. Darstellung des prozentualen Anteils nekrotischer Zellen mittels Annexin-FITC-Test (FACS-Messung, logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle (schwarze Linie). Positivkontrolle mit 6 μM Staurosporin dargestellt durch rote Linie. Nicht dargestellt sind die Positivkontrollen mit 4 μM (6% nekrotische Zellen), 2 μM (4% nekrotische Zellen) und 1 μM (6% nekrotische Zellen) Staurosporin. Staurosporin dient hierbei v.a. als Positivkontrolle für Apoptose- und nicht für Nekroseinduktion.

Die entsprechenden Messergebnisse sind in den Tabellen 8a und b sowie in den Abbildungen 10a und b dargestellt.

Das zweite Ziel des Tests war die Einstufung des Nekrose- und Apoptosepotentials der Konzentrationsreihe der 0,1 N Salzsäure im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Arbeitshypothese war hier, dass die unterschiedlichen Konzentrationen der Salzsäure als wesentlicher Bestandteil des Magensaftes in der Lage sind, sowohl die Apoptoserate als auch die

Nekroserate im Vergleich zur Negativkontrolle zu erhöhen. Dies war hinsichtlich der Apoptoserate in der Konzentration 1:40 der Fall, sodass hier ein Verdachtsmoment der Apoptoseinduktionsfähigkeit besteht.

Tabelle 8a: Konzentrationsabhängige Apoptoserate (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Magensaftproben in Prozent im Annexin FITC-Test. *p*-Werte sind im Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle dargestellt. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (6 μ M Staurosporin): 49,00%; Positiv 2 (4 μ M Staurosporin): 47,00%; Positiv 3 (2 μ M Staurosporin): 43,00% und Positiv 4 (1 μ M Staurosporin): 19,00%.

Magensaftkonzentration	Prozent apoptotischer Zellen (Magensäfte)						p-Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	6,30 \pm 0,27	6,0	6,0	6,5	6,5	6,5	0,374
1:20	6,30 \pm 0,27	6,5	6,0	6,0	6,5	6,5	0,374
1:40	6,00 \pm 0,00	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	1,000
Negativkontrolle	6,0						

Tabelle 8b: Konzentrationsabhängige Nekroserate (Mittelwert \pm Standardabweichung) der Magensaftproben in Prozent im Annexin-FITC-Test. *P*-Werte sind im Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle dargestellt. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (6 μ M Staurosporin): 7,00%; Positiv 2 (4 μ M Staurosporin): 6,00%; Positiv 3 (2 μ M Staurosporin): 4,00% und Positiv 4 (1 μ M Staurosporin): 6,00%.

Magensaftkonzentration	Prozent nekrotischer Zellen (Magensäfte)						p-Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	4,20 \pm 0,45	5,0	4,0	4,0	4,0	4,0	0,178
1:20	4,60 \pm 0,22	4,5	5,0	4,5	4,5	4,5	0,178
1:40	4,40 \pm 0,55	4,5	5,0	4,5	3,5	4,5	0,374
Negativkontrolle	5,0						

Die Ergebnisse waren nicht signifikant. (Tabellen 8c, d, Abbildungen 10a, b). Sowohl Apoptose- als auch Nekroserate der Salzsäure waren nicht konzentrationsabhängig (jeweils $p=1,000$).

Tabelle 8c: Konzentrationsabhängige Apoptoserate der 0,1 N Salzsäure in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle im Annexin-FITC-Test. Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (6 μ M Staurosporin): 49,00%; Positiv 2 (4 μ M Staurosporin): 47,00%; Positiv 3 (2 μ M Staurosporin): 43,00% und Positiv 4 (1 μ M Staurosporin): 19,00%.

Salzsäurekonzentration	Prozent apoptotischer Zellen	p-Wert
1:10	6,0	1,000
1:20	6,0	1,000
1:40	6,5	0,884
Negativkontrolle	6,0	

Tabelle 8d: Konzentrationsabhängige Nekroserate der 0,1 N Salzsäure in Prozent im Vergleich zur Negativkontrolle im Annexin-FITC-Test. Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich. Werte der Positivkontrollen: Positiv 1 (6 μ M Staurosporin): 7,00%; Positiv 2 (4 μ M Staurosporin): 6,00%; Positiv 3 (2 μ M Staurosporin): 4,00% und Positiv 4 (1 μ M Staurosporin): 6,00%.

Salzsäurekonzentration	Prozent nekrotischer Zellen	p-Wert
1:10	5,0	1,000
1:20	4,5	0,868
1:40	5,0	1,000
Negativkontrolle	5,0	

4.2.4 Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung mittels des Nukleosomen Nachweises (CDD⁺-ELISA)

Dieser Test basiert auch auf dem Nachweis der Zytoxizität, jedoch nicht anhand einer FACS-Bestimmung sondern anhand eines ELISAs. Auch der CDD⁺-ELISA ist in der Lage, das Potential der Apoptoseinduktion einer Substanz zu bestimmen. Anders als in den Testsystemen zuvor wird hierbei die Zahl der nekrotischen Zellen nicht erfasst bzw. diskriminiert. Basis des

Testes ist die Bildung von Nukleosomen während der Apoptosekaskade. Die Nukleosomen werden im Zytoplasma nachweisbar (siehe D in Abbildung 5). In dem ELISA wird nicht der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen sondern ein Index als Maß desselben bestimmt. Gegenstand der Überprüfung anhand dieser Testmethode war ein kurzer Belastungszeitraum.

Als Arbeitshypothese war zu prüfen, ob die Magensäfte Apoptose in den U937-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach drei Stunden Belastung induzieren können. Ausgegangen wurde wiederum von einem höheren Apoptoseindex bei Testung der Magensäfte.

Die Magensäfte waren in jeder der getesteten Konzentrationen in der Lage, einen im Mittel höheren Apoptoseindex (respektive einer höheren optischen Dichte) nach dem Belastungszeitraum drei Stunden zu induzieren, sodass ein Verdachtsmoment für die Apoptoseinduktion besteht (Abbildung 11).

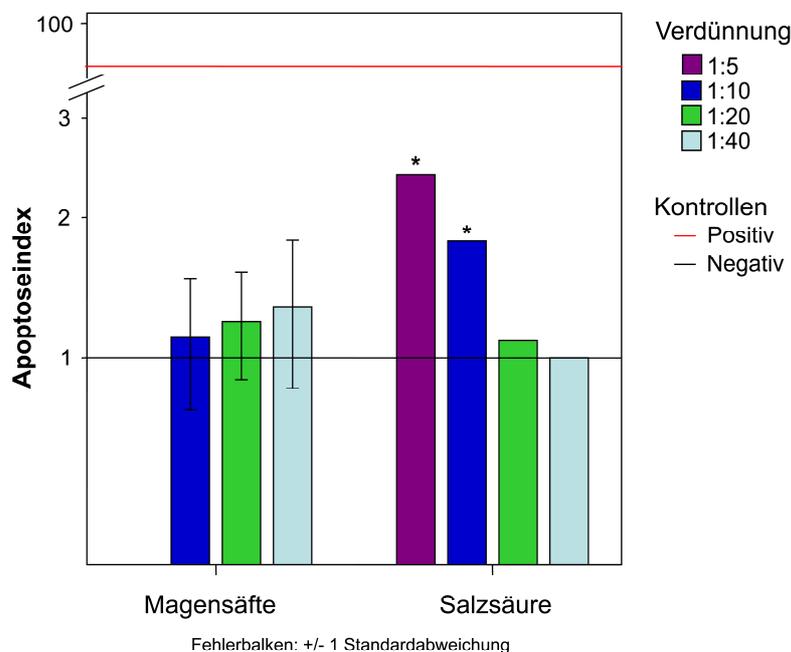


Abbildung 11. Darstellung des Apoptoseindexes mittels CDD⁺-Test (logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle. Stern (*) steht für Signifikanz der Optischen Dichtedifferenz im Vergleich zur Negativkontrolle ($p < 0,05$).

Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied der Apoptoseindices oder optischen Dichte im Vergleich zur Negativkontrolle (Tabellen 9a, b). Die Arbeitshypothese, dass die Konzentration des Magensaftes einen Einfluss auf den Apoptoseindex hat sollte sekundär ebenfalls geprüft werden. Die Analyse zeigte keinen signifikanten Effekt der Konzentration auf das entsprechende Testergebnis auch wenn mit steigender Konzentration der mittlere Apoptoseindex anstieg ($p=0,585$). Die einzelnen Magensaftproben zeigten hierbei keine

interindividuellen signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Apoptoseindex ($p=0,544$). Die entsprechenden Messergebnisse sind in den Tabellen 9a und b sowie in der Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 9a und b: Apoptoseindices der Magensäfte und Optische Dichten (OD) im CDD⁺-ELISA (Mittelwerte±Standardabweichung). Die dargestellten p -Werte resultieren aus dem Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle. Wert der Positivkontrolle: 69,3 (OD: $2,921±0,463$).

Magensaftkonzentration	Apoptoseindex (Magensäfte)						p -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	1,12±0,40	1,5	0,8	0,8	1,3	0,9	0,630
1:20	1,32±0,38	1,0	1,7	1,9	1,6	1,3	0,322
1:40	1,34±0,48	0,6	1,2	1,6	0,9	1,3	0,313
Negativkontrolle	1,0						

Magensaftkonzentration	Optische Dichte (Magensäfte)						p -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	0,047±0,019	0,062	0,034	0,033	0,067	0,038	0,611
1:20	0,052±0,015	0,043	0,073	0,035	0,054	0,057	0,216
1:40	0,056±0,022	0,027	0,051	0,079	0,069	0,055	0,181
Negativkontrolle	0,042±0,014						

Das Apoptosepotential der 0,1 N Salzsäure wurde ebenfalls in diesem Testsystem untersucht. Hypothese war auch hier, dass die Salzsäurekonzentrationen in der Lage sind, einen höheren Apoptoseindex (respektive eine höhere optische Dichte) als die Negativkontrolle zu induzieren. Der Apoptoseindex der Salzsäure war bei den höheren Konzentrationen (1:5 bis 1:20) größer als der der Negativkontrolle. In der Konzentration 1:5 betrug dieser 240% ($p=0,002$) und in der Konzentration 1:10 betrug dieser 180% ($p=0,041$) dessen der Negativkontrolle. In beiden Konzentrationen war der Unterschied bei Vergleich der optischen Dichtewerte signifikant. Der Einfluss der Konzentration der Salzsäure auf den Apoptoseindex war jedoch nicht signifikant ($p=0,114$). (Tabellen 9c, Abbildung 11).

Tabelle 9c: Konzentrationsabhängige Apoptoseindices (Optische Dichte±Standardabweichung) der 0,1 N Salzsäure im CDD⁺-ELISA. Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich (signifikante *p*-Werte sind fett hervorgehoben; Student's t-Test der optischen Dichten [OD]).

Salzsäurekonzentration	Apoptoseindex (Optische Dichte)	p-Wert (OD)
1:5	2,4 (0,099±0,006)	0,002
1:10	1,8 (0,074±0,019)	0,041
1:20	1,1 (0,044±0,014)	0,867
1:40	1,0 (0,040±0,020)	0,876
Negativkontrolle	1,00 (0,042±0,014)	

4.2.5 Ergebnisse des Caspase-Assays

Wie der vorherige Test so ist auch der Caspase-Assay in der Lage, das Potential der Apoptoseinduktion einer Substanz zu erfassen. Zielpunkt ist die Aktivitätsbestimmung von während der Apoptosekaskade aktivierten Caspasen (siehe G in Abbildung 5). Der Assay ist nicht in der Lage Apoptose von Nekrose zu diskriminieren. Auch im Caspase-Assay erfolgt die Bestimmung der apoptotischen Wirkung über den Apoptoseindex. Das Testsystem fungierte zur Überprüfung eines kurzfristigen Belastungszeitraumes.

Als Arbeitshypothese dieses Tests war zu prüfen, ob die Magensäfte Apoptose in den U937-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach drei Stunden Belastung induzieren können. Ausgegangen wurde wiederum von einem höheren Apoptoseindex im Test der Magensäfte.

Die Magensäfte waren in jeder der getesteten Konzentrationen in der Lage, einen im Mittel höheren Apoptoseindex nach dem Belastungszeitraum zu induzieren, sodass ein Verdachtsmoment für die Apoptoseinduktion besteht (Abbildung 12).

Die statistische Auswertung zeigte im direkten Vergleich der Rhodaminkonzentrationen der Konzentration 1:10 mit der der Negativkontrolle einen signifikanten Unterschied ($p=0,044$).

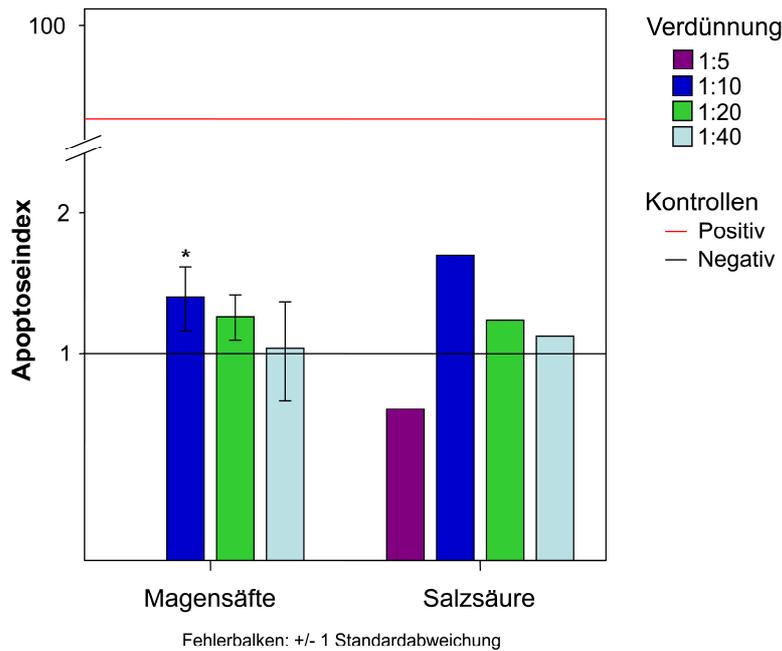


Abbildung 12. Darstellung des Apoptoseindexes mittels Caspase-Assay (logarithmische Skala) nach Belastung mit den Konzentrationsreihen der Magensäfte sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich untereinander sowie zur Negativkontrolle. Stern (*) steht für Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle bei Vergleich der Rhodaminkonzentration ($p < 0,05$).

Im Vergleich der Apoptoseindices der Magensäfte mit dem der Negativkontrolle konnte keine Signifikanz festgestellt werden (Tabellen 10 a und b).

Die Arbeitshypothese, dass die Konzentration des Magensaftes einen Einfluss auf den Apoptoseindex hat sollte separat geprüft werden. Die Analyse zeigte einen signifikanten Effekt der Konzentration auf das entsprechende Testergebnis ($p = 0,012$).

Tabelle 10a: Apoptoseindices der Magensäfte (Mittelwerte±Standardabweichung) im Caspase-Assay. Die dargestellten p -Werte resultieren aus dem Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle. Wert der Positivkontrolle: 44,35.

Magensaft- konzentration	Apoptoseindex (Magensäfte)						p -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	1,36±0,22	1,30	1,35	1,40	1,65	1,05	0,212
1:20	1,24±0,13	1,20	1,35	1,25	1,40	1,00	0,236
1:40	1,04±0,29	1,15	0,55	1,15	1,30	1,00	0,929
Negativkontrolle	1,00						

Tabelle 10b: Rhodaminkonzentrationen (nM) der Magensäfte (Mittelwerte±Standardabweichung) im Caspase-Assay. Die dargestellten *p*-Werte resultieren aus dem Vergleich der fünf Magensäfte zur Negativkontrolle. Wert der Positivkontrolle: 809,0.

Magensaftkonzentration	Rhodaminkonzentration (Magensäfte)						<i>p</i> -Wert
	gesamt	1	2	3	4	5	
1:10	23,6±3,5	23,0	23,0	25,0	28,5	18,5	0,044
1:20	21,0±2,4	20,5	21,0	22,0	24,0	17,5	0,082
1:40	17,8±4,4	19,5	10,5	19,5	22,0	17,5	0,933
Negativkontrolle	17,5±2,1						

Die einzelnen Magensaftproben zeigten hierbei keine interindividuellen signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Apoptoseindex ($p=0,052$). Die entsprechenden Messergebnisse sind in der Tabelle 10a und b sowie in Abbildung 12 dargestellt.

Das Apoptosepotential der 0,1 N Salzsäure wurde ebenfalls in diesem Testsystem untersucht. Hypothese war auch hier, dass die Salzsäurekonzentrationen in der Lage sind, einen höheren Apoptoseindex respektive einer höheren Rhodaminkonzentration im Test im Vergleich zur Negativkontrolle zu induzieren.

Der Apoptoseindex der Salzsäure war außer bei der Konzentration 1:5 immer größer als der der Negativkontrolle, sodass das Verdachtsmoment einer Apoptoseinduktion durch diese Salzsäurekonzentrationen besteht.

Tabelle 10c: Konzentrationsabhängige Apoptoseindices der 0,1 N Salzsäurekonzentrationsreihe im Caspase-Assay. (Rhodaminkonzentration [nM] Mittelwert±Standardabweichung) Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich (t-Test der Rhodaminkonzentrationen). (* Fehlbestimmung wahrscheinlich.)

Salzsäurekonzentration	Apoptoseindex (Rhodaminkonzentration)	<i>p</i> -Wert
1:5	0,70 (13,0±17,0)*	0,746*
1:10	1,65 (28,5±4,9)	0,102
1:20	1,15 (21,5±4,9)	0,404
1:40	1,10 (19,0±2,8)	0,609
Negativkontrolle	1,0 (17,5±2,1)	

Bei einer sehr hohen Standardabweichung der Ergebnisse der Konzentration 1:5 und einer starken Diskrepanz der Einzelwerte bei Doppelbestimmung muss jedoch von einer Fehlbestimmung in einem der Testdurchläufe ausgegangen werden. In keiner der Konzentrationen war der Unterschied der Rhodaminkonzentrationen respektive der Apoptoseindices zur denen der Negativkontrolle signifikant (Tabelle 10c, Abbildung 12).

Der Einfluss der Konzentration der Salzsäure auf den Apoptoseindex war ebenfalls nicht signifikant ($p=1,000$).

4.3 Ergebnisse der Gentoxizitätsprüfung mittels Mikrokerntest

Anders als die vorangegangenen Testsysteme bezieht sich der Mikrokerntest nicht auf die Testung von Zytotoxizität infolge Apoptose- und Nekroseinduktion, sondern untersucht die direkten Einflüsse von Noxen auf die DNA, also die direkte Gentoxizität basierend auf der Entstehung von Mikrokernen bzw. Mikrokernraten (siehe A in Abbildung 5).

4.3.1 Testergebnisse nach Säureexposition

Bei der Testung der Salzsäure wurde im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen der Schwerpunkt nicht ausschließlich auf die Konzentration der Noxe, sondern auf den zeitlichen Verlauf der Schädigung gelegt. Dementsprechend wurden die Arbeitshypothesen geprüft, ob bei steigender Säurebelastungszeit und gleichbleibender Säurebelastung die Mikrokern (MK-) rate der getesteten Zellen steigt und ob die Mikrokernrate zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als die der Negativkontrolle ist.

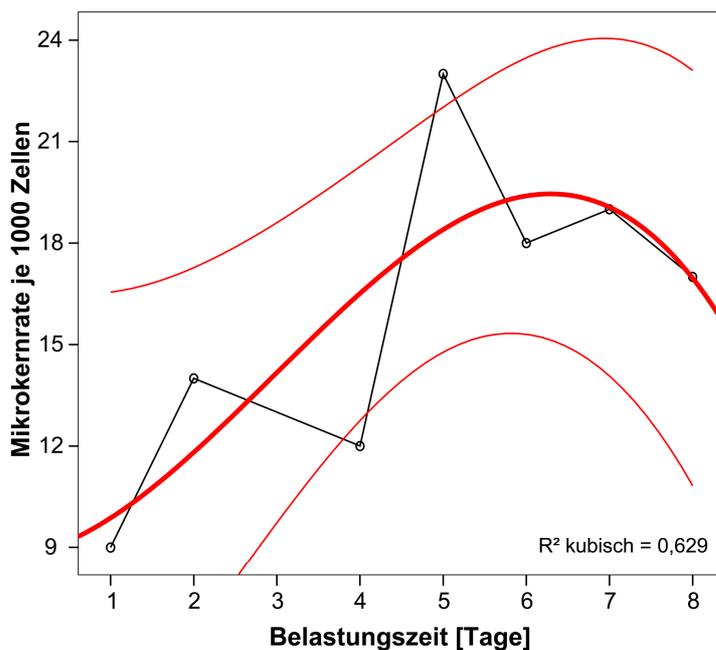


Abbildung 13. Darstellung der Mikrokernelrate (je 1000 Zellen) nach Belastung mit 0,1 N Salzsäure über acht Tage unter Umsetzen der Zellen alle 24 Stunden. Tag 3 ohne Messwert aufgrund von Verunreinigung. Dicke rote Linie: gemittelte kubische Trendlinie. Dünne rote Linien: 95% Konfidenzintervall.

Der Einfluss der Belastungszeit zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Mikrokernelrate ($p=0,001$). Die Abhängigkeit der Mikrokernelrate von der Belastungszeit zeigt ein Maximum nach fünf Tagen Belastung und entspricht etwa einem kubischen Verlauf ($R^2=0,63$, Abbildung 13).

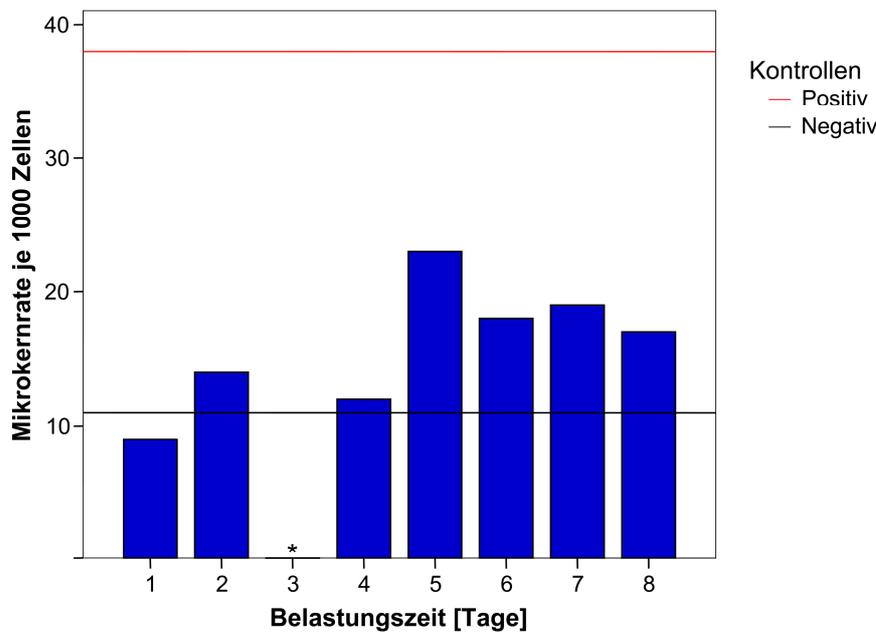


Abbildung 14. Darstellung der Mikrokernrate (je 1000 Zellen) nach Belastung mit 0,1N Salzsäure im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle über acht Tage unter Umsetzen der Zellen alle 24 Stunden. (*Tag 3 ohne Messwert aufgrund von Verunreinigung)

Die Mikrokernrate nach Säurebelastung war ab dem zweiten Tag der Belastung höher als die der Negativkontrolle (nach acht Tagen Belastung) (Abbildung 14, Tabelle 11).

Tabelle 11a: Mikrokernrate je 1000 Zellen nach Exposition mit 0,1 N Salzsäure bei steigender Belastungszeit (Umsetzen alle 24 Stunden) im Vergleich zur Mikrokernrate der Negativkontrolle (nach 8 Tagen Belastung). Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich. Mikrokernrate der Positivkontrolle: 38, die der Negativkontrolle: 11. (*Belastungszeit drei Tage wegen Verunreinigung nicht auswertbar.)

Belastungszeit (0,1 N Salzsäure)	Mikrokernrate (je 1000 Zellen)	p-Wert
24h	9	0,823
48h	14	0,555
3 Tage	n.a.*	n.a.*
4 Tage	12	1,000
5 Tage	23	0,056
6 Tage	18	0,261
7 Tage	19	0,147
8 Tage	17	0,262

Hieraus resultiert ein starkes Verdachtsmoment, dass die Säurebelastung die Mikrokernrate über die Zeit beeinflusst. In der statistischen Auswertung war dieser Zusammenhang zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikant (Tabelle 11a, Abbildung 14).

4.2.2 Testergebnisse nach Exposition von Magensaft

Aufgrund des gering verfügbaren Testmaterials fand die Untersuchung der Mikrokernrate induziert durch die Magensaftproben nur über einen Expositionszeitraum von 24 Stunden und mit einer Testkonzentration statt. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand die Hypothese, dass die Exposition von Magensaft eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Mikrokernrate aufweist und somit genotoxisch wirkt.

Die vorliegenden Testergebnisse zeigen eine im Mittel höhere MK-Rate nach Exposition gegenüber den Magensäften, woraus ein Verdachtsmoment resultiert, dass Magensaft die Mikrokernrate erhöht. Dieser Zusammenhang war nicht signifikant (Tabelle 11b, Abbildung 15).

Tabelle 11b: Mikrokernrate je 1000 Zellen nach Exposition mit den einzelnen sowie mit allen Magensaftproben (Mittelwert±Standardabweichung) im Vergleich zur Mikrokernrate der Negativkontrolle nach 24 Stunden Belastung. Darstellung der *p*-Werte im Kreuzvergleich (Fisher's Exact-Test; *Allgemeines lineares Modell).

Magensaftproben	Mikrokernrate (je 1000 Zellen)	p-Wert
Probe 1-5	15,40±6,45	0,569*
Probe 1	10	0,539
Probe 2	25	0,070
Probe 3	19	0,292
Probe 4	12	0,844
Probe 5	11	0,688
Negativkontrolle	13	

Die Mikrokernrate der einzelnen Magensaftproben war inhomogen. Während die Proben eins, vier und fünf eine geringere MK-Rate als die Negativkontrolle nach der 24 Stunden Belastung aufwiesen, zeigten die Proben zwei und drei eine deutlich höhere MK-Rate. Dies führte zu einem signifikanten Unterschied der MK-Rate der Probe zwei im Vergleich zu den Proben eins ($p=0,016$), vier ($p=0,045$) und fünf ($p=0,027$) (Tabelle 11b, Abbildung 15).

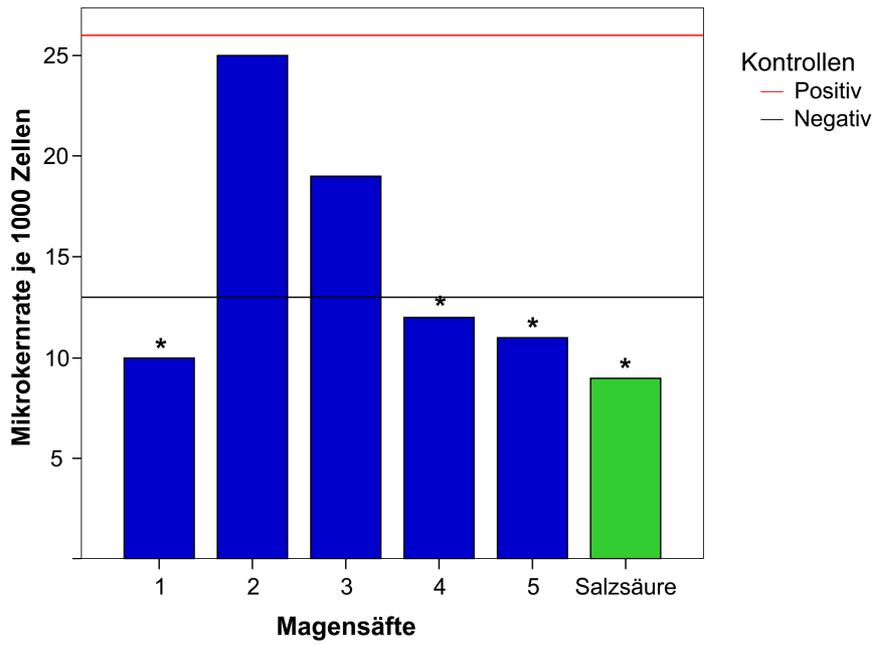


Abbildung 15. Darstellung der Mikrokernrate (je 1000 Zellen) nach Belastung mit den einzelnen Magensaftproben sowie der 0,1 N Salzsäure im Vergleich zur Negativkontrolle über 24 Stunden. (* $p < 0.05$ im Vergleich zur Magensäureprobe 2; Fisher's Exact-Test)

5. Diskussion

5.1 Generelle Ergebnisse der geprüften Hypothesen

Diese Arbeit ist die erste systematische Untersuchung bezüglich des Schädigungsmechanismus von Magensaft. Gegenstand der differentiellen Betrachtung war zum Einen das direkt gentoxische Potential und zum Anderen das zytotoxische Potential bedingt durch Apoptose- und Nekroseinduktion anhand von in-vitro-Testsystemen an Säugerzellkulturen. Ziel der Arbeit war es, Verdachtsmomente und gegebenenfalls signifikante Effekte aufzudecken und somit als Orientierungsmessung zur Planung umfangreicherer und aufwendigerer Experimente zu fungieren [172]. Die klinische Bedeutung erlangt die Unterscheidung zwischen direkter Gentoxizität und Zytotoxizität aufgrund der abnehmenden Reversibilität der Schädigung je direkter diese in einer Gentoxizität mündet (Abbildung 16). Darüber hinaus ist im Rahmen der zytotoxischen Prozesse der Krebsentstehung eventuell eine Intervention möglich. Diese ist abhängig von der Art des Schädigungsmechanismus innerhalb der Apoptosekaskade sowie von der aus Nekrose resultierenden Entzündungsreaktion.

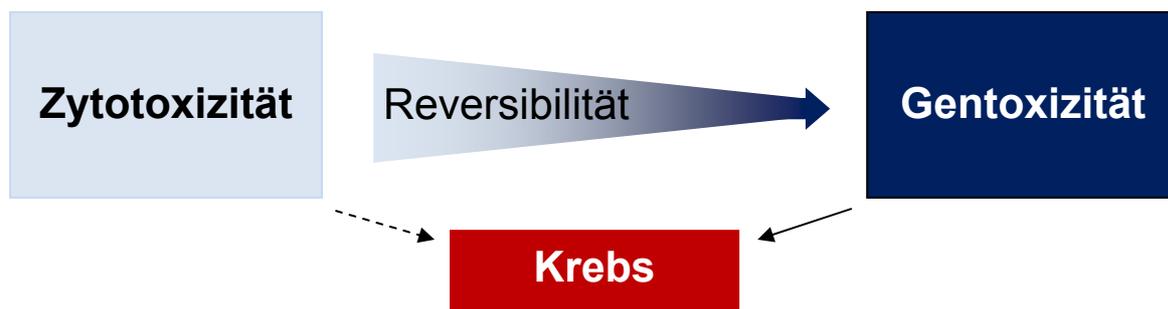


Abbildung 16. Abnahme der Reversibilität mit Ausmaß der Gentoxizität. Zytotoxizität als potentiell reversibler Prozess resultiert über die Dauer der Schädigung in genetischen Veränderungen und wirkt somit indirekt gentoxisch. Genetische Schäden zeigen deutlich geringere Reversibilität und führen im Sinne von DNA-Schäden direkter zur Kanzerogenese. Mit der Reversibilität sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Restitutio ad integrum.

Eine Hypothese der vorliegenden Studie war das Vorliegen direkter Gentoxizität des Magensaftes. Anhand der benutzten Verfahren konnte diese Eigenschaft bei beiden Substanzen im Sinne einer Signifikanz nicht nachgewiesen werden. Dennoch bestehen starke Verdachtsmomente hinsichtlich einer direkten Gentoxizität beider Substanzen.

Eine weitere Hypothese war die Expositionszeitabhängigkeit des gentoxischen Potentials der Salzsäure, welche anhand der steigenden Mikrokernraten über den Zeitverlauf belegt werden konnte.

Ein deutliches Überwiegen von Nekrose im Vergleich zur Apoptose wurde nicht ermittelt. Stattdessen zeigte sich in einem geringen Teil der Testsysteme eine signifikante Steigerung der Apoptose nach Kurzzeitexposition gegenüber beiden Testsubstanzen. Nach längerfristiger Belastung mit Magensaft oder Salzsäure existieren Verdachtsmomente einer gesteigerten Nekrose bei uneinheitlichen Apoptoseergebnissen. Auch wenn ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich Nekrose und Apoptose in Testsystemen mit unterschiedlicher Expositionszeit festgestellt wurde, konnte kein Test einen signifikanten Einfluss der Expositionszeit aufdecken. So bestehen auch hier nur Verdachtsmomente. Im Kurzzeitintervall der Belastung konnte in einem Teil der Testsysteme eine Abhängigkeit der Apoptose von der Konzentration der Magensäfte, nicht jedoch der Salzsäure nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist eventuell auf eine Überlagerung durch unbekannte Effekte weiterer Magensaftinhaltsstoffe zurückzuführen.

5.2 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Zytotoxizitätstests gegenübergestellt und diskutiert. Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12. Zusammenfassung der Apoptose und Nekrosetestergebnisse. Aufwärtspfeile in Klammern stehen für Verdachtsmomente aufgrund höherer Raten/Indices ohne Signifikanz in der statistischen Prüfung, Aufwärtspfeile ohne Klammern symbolisieren partiell signifikante Ergebnisse im Testsystem. Pfeile nach rechts symbolisieren keine Erhöhung der entsprechenden Rate im Test. Stern (*) entspricht einem signifikanten Einfluss der Konzentration der Testsubstanzen. (h) – Effekt bei hoher Konzentration; (n) – Effekt bei niedriger Konzentration. Großbuchstaben (C-G) entsprechen denen in Abbildung 5.

Testsubstanz	Belastungszeit	Apoptose	Nekrose	Endpunkt
Magensäfte	kurz	↑	→	Caspaseaktivität* (G)
		(↑)	→	Caspaseaktivität* (G) Zellmembranphospholipide* (F) Nukleosomenbildung (D)
	lang	(↑) ^h	(↑) ⁿ	Nukleosomenbildung (C), Mitochondrienmembranpotential (E)
Salzsäure	kurz	↑	→	Nukleosomenbildung ^h (D)
		(↑)	→	Zellmembranphospholipide (F) Caspaseaktivität (G) Nukleosomenbildung (D)
	lang	→	(↑)	Nukleosomenbildung (C)

5.2.1 Apoptose

Bei den durchgeführten Testsystemen zur Prüfung des Apoptoseverhaltens wurden drei der Tests zur Überprüfung kurzer Belastungszeiträume von zwei bis drei Stunden und zwei Tests zur Überprüfung längerfristiger Belastungszeiten von 24-48 Stunden durchgeführt.

Die Testergebnisse der Magensäfte ergaben zum Teil signifikant erhöhte Apoptoseraten nach kurzfristiger Belastung. Alle drei diesbezüglich angewandten Testsysteme führten daher zu

Verdachtsmomenten hinsichtlich einer Apoptosesteigerung nach Kurzzeitbelastung. Diese Effekte waren in zwei der drei durchgeführten Tests von der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz abhängig. Hierbei führte eine höhere Konzentration zu einer höheren Apoptoserate, so dass im Caspase-Assay auch nur die höchste der eingesetzten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle aufwies.

Eine kurzfristige Belastung resultierte relativ einheitlich in einer Apoptoseratensteigerung. Die längerfristige Belastung mit Magensäften führte in den beiden angewandten Testsystemen zu testendpunkt- bzw. testmethodikspezifischen Ergebnissen. Das bedeutet, dass je nach Konzentration der Noxe ein anderer Mechanismus der Apoptosekaskade aktiviert zu werden scheint, was durch die Tests unterschiedlich abgebildet wurde. Während im Propidiumjodid-Test nach 24 Stunden eine Erhöhung der Apoptoserate in der höchsten eingesetzten Konzentration beobachtet wurde, konnte dieser Effekt im MMP-Test erst nach 48 Stunden nachgewiesen werden, wobei diese beiden Ergebnisse nicht signifikant waren. Zumindest muss man den Verdacht aussprechen, dass auch eine Langzeitbelastung eine Steigerung der Apoptose auslösen kann. Eine Abhängigkeit von der Konzentration oder der Belastungszeit im direkten Vergleich zwischen 24 und 48 Stunden (MMP-Test) konnte nicht ermittelt werden.

In keinem der Apoptosetests waren interindividuelle Unterschiede der Magensäfte festzustellen. Der Anteil apoptotischer Zellen bewegte sich etwa im Bereich von drei bis vier (Propidiumjodid, Mitochondrienmembranpotential) bzw. um die sechs Prozent (Annexin-FITC).

Auch Apoptoseraten/-indices der eingesetzten Salzsäurekonzentrationsreihe zeigten nach Kurzzeitbelastung zum Teil signifikante Testergebnisse. Die Apoptose war ähnlich der Tests der Magensäuren bei höheren Konzentrationen der Salzsäure gesteigert. Ein signifikanter Effekt der Säurekonzentration selbst auf die Apoptoserate nach Kurzzeitexposition war jedoch nicht festzustellen. Im CDD⁺-Test kann man signifikante Werte sowie ein kontinuierliches Abfallen des Apoptoseindex in Abhängigkeit der Konzentration der Salzsäure beobachten. Dies spricht eventuell für eine höhere Sensitivität der Testmethode für den eigentlichen Schädigungsmechanismus in der Apoptosekaskade der Salzsäure. Auch im Caspase-Assay ist ein ähnliches Gefälle der Apoptoseindices zu beobachten, wenn man die Konzentration 1:5 nicht berücksichtigt, da bei dieser von einer Verunreinigung bzw. Fehlbestimmung auszugehen ist. Die bei der geringsten Konzentration leicht erhöhte aber nicht signifikant erhöhte Apoptoserate im Annexin-FITC-Test kann ist möglicherweise Konsequenz einer spezifischen Aktivierung dieses Apoptosemechanismus (F in Abbildung 5) bei geringen Konzentrationen. Schlussfolgernd bestehen auch bei der Kurzzeitbelastung der Salzsäure starke Verdachtsmomente bezüglich einer konzentrationsabhängig gesteigerten Apoptose nach Kurzzeitbelastung

Zur Beurteilung des Langzeitbelastungsverhaltens hinsichtlich Apoptose kam bei der Salzsäure nur der Propidiumjodid-Test zum Einsatz. Dieser konnte jedoch keine gesteigerte Apoptose nachweisen bzw. resultieren aus den Ergebnissen keine Hinweise oder Verdachtsmomente eines gesteigerten Apoptoseverhaltens nach 24 Stunden Belastung mit Salzsäure. konzentrationsabhängige Effekte konnten nach Langzeitbelastung nicht ermittelt werden.

Trotz der geringen Probenanzahl konnte in allen Testsystemen bei beiden Testsubstanzgruppen Differenzen ermittelt werden, auch wenn diese aufgrund der geringen statistischen Power und möglicherweise existierender interindividueller Unterschiede relativ gering und selten signifikant ausfielen. Die nachgewiesenen Effekte betrafen hauptsächlich die hohen Konzentrationen. Signifikante Einflüsse, verursacht durch geringere Konzentrationen, sind dennoch aufgrund der geringen Probenanzahl nicht auszuschließen. Größer angelegte Folgestudien könnten möglicherweise entsprechende Effekte geringerer Konzentrationen nachweisen.

Ziel der Apoptosebestimmung war es, abzuschätzen, inwiefern die vorliegenden Magensäfte bzw. die Salzsäure selbst in der Lage sind, den programmierten Zelltod einzuleiten. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte in einem Teil der Tests (Caspase-Assay, CDD⁺-Test) nachgewiesen werden, dass Magensaft und Salzsäure als wesentlicher Bestandteil des Magensaftes über Apoptoseinduktion zytotoxisch wirken können und somit krebsfördernd sind. Diese Effekte betreffen vor allem die Kurzzeitexposition von zwei bis drei Stunden und erscheinen konzentrationsabhängig. Darüberhinaus resultieren aus dem anderen Teil der Testergebnisse starke Verdachtsmomente, welche die signifikanten Ergebnisse untermauern und auch bei langfristiger Belastung mit den Substanzen eine Fähigkeit zur Apoptoseinduktion vermuten lassen.

Wie initial erwähnt, ist auch Apoptose ein Mechanismus, welcher durchaus in der Lage ist, die Krebsentstehung zu fördern. Möglichkeiten bestehen hierbei durch den nach Zelluntergang einsetzenden gesteigerten Regenerationsprozess mit vermehrter Zellteilung. Zum anderen kann es eventuell zu einer Art Selektion der Zellen, welche apoptoseresistent sind, kommen. Dennoch besteht der Unterschied in der Art, wie die Zellreste nach dem Zelltod vom Körper eliminiert werden. So ruft die Apoptose in der Regel keine Entzündungsreaktion hervor, da die zytosolischen Bestandteile, welche bei direktem Freiwerden als Fremdanigen fungieren würden, hier in Vesikel verpackt von Makrophagen phagozytiert werden, ohne „Fremdanigen“-Präsenz.

5.2.2 Nekrose

Testsystemspezifisch waren drei der fünf Apoptose-Testsysteme in der Lage zwischen Apoptose- und Nekroserate zu differenzieren. Entsprechend bezog sich nur der Annexin-Test auf einen kurzen Belastungszeitraum.

Im Gegensatz zur Erhöhung der Apoptoseraten resultierte die Untersuchung der Kurzzeitbelastung mit Magensäften weder in signifikant erhöhten Nekroseraten, noch lassen sich Verdachtsmomente bezüglich einer erhöhten Nekroserate ableiten. Auch eine Konzentrationsabhängigkeit ließ sich nicht beobachten, sodass nicht von einer kurzzeitbelastungsabhängigen Nekroseinduktion durch Magensaft auszugehen ist.

Nach Langzeitbelastung resultieren aus den Versuchen test- bzw. endpunktspezifische Ergebnisse. Während im Propidiumjodid-Test nach 24 Stunden eine nicht signifikant erhöhte Nekroserate bei der geringsten der eingesetzten Konzentrationen zu beobachten war, konnte im MMP-Test erst nach 48 Stunden eine leichte Erhöhung festgestellt werden, was möglicherweise auf die unterschiedlichen Endpunkte der Testsysteme zurückzuführen ist. Die Nekroseraten schwankten im Mittel je nach Test zwischen fünf und acht Prozent. Zu bemerken ist, dass beim Propidiumjodidtest bei hohen Konzentrationen bevor es zu einer Nekrose kommt die Zellen scheinbar mit Apoptose reagieren, während die chronische Belastung mit gering konzentriertem Magensaft eine Nekrose auslöste. Die Signalkaskade der Apoptose konnte also nur durch ein stark schädigendes Signal ausgelöst werden, jedoch führen möglicherweise chronische Belastungen mit geringen Magensaftkonzentrationen eher zu einer entzündungsfördernden Schädigung auf Basis von Nekrose.

Trotz nicht nachweisbarer Konzentrationsabhängigkeit und nicht nachweisbarer interindividueller Unterschiede bestehen zumindest leichte Verdachtsmomente, dass Magensaft zu einer Nekroseinduktion nach Langzeitbelastung führen kann. Auch hier wären, entsprechend der geringen statistischen Power der durchgeführten Versuche, diese Effekte nur in größer angelegten Studien statistisch zu sichern oder auszuschließen.

Auch die Salzsäure zeigt im Annexin-Test nach Kurzzeitbelastung keinerlei konzentrationsabhängigen Effekt bzw. eine Erhöhung der Nekroserate. Dementsprechend lassen sich auch für die Salzsäure keine Verdachtsmomente einer kurzzeitbelastungsabhängigen Nekroseinduktion ableiten. Bei Langzeitbelastung jedoch ließen sich in jeder der eingesetzten Konzentrationen nicht signifikant erhöhte Nekroseraten nachweisen, sodass sich hier Verdachtsmomente einer Nekroseinduktion ableiten lassen. Die Konzentration schien hierbei keinen signifikanten Einfluss zu haben.

Ziel der Tests auf Nekroseinduktion war es, indirekt abzuschätzen, inwieweit Magensaft bzw. die Salzsäure als wesentlicher Hauptbestandteil desselben in der Lage ist, über Nekrose entzündungsinduzierende Zellbestandteile freizusetzen. Anhand der vorliegenden Testergebnisse kann nicht sicher geschlussfolgert werden, dass Nekrose der primär schädigende Mechanismus des Magensaftes respektive der Salzsäure ist. Jedoch resultieren Verdachtsmomente, die zumindest nach Langzeitexposition eine partielle Mitbeteiligung der Nekrose am Schädigungsmechanismus des Magensaftes bzw. der Salzsäure nahelegen.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests mit der wissenschaftlichen Literatur

Derzeit ist kein *in vitro* Testsystem allein in der Lage eine suffiziente Aussage hinsichtlich Apoptose-/Nekroseinduktion zu treffen. Aus diesem Grund wird in der Literatur die Verwendung mehrerer Testsysteme empfohlen, um verschiedene Aspekte der komplexen Apoptosekaskade zu beleuchten [167]. Trotz Anwendung von fünf verschiedenen Testsystemen ist es anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich, sicher zu schlussfolgern, dass Apoptose oder Nekrose der alleinige Hauptschädigungsmechanismus der geprüften Substanzen ist. Die Ergebnisse der Apoptosetestung belegen im Kontrast zu den Nekrosetestungen, dass sowohl für Magensaft als auch für Salzsäure nach einem kurzen Belastungszeitraum die Apoptose ein wesentlicher und konzentrationsabhängiger Schädigungsmechanismus ist. Nekrose scheint in diesem Zeitfenster eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Nach Langzeitbelastung erscheint das Schädigungsmuster bei Belastung durch Magensäfte testspezifisch. Sowohl Verdachtsmomente für Apoptose als auch für Nekrose lassen sich erheben, können jedoch nicht in jedem Fall durch signifikante Messwerte belegt werden. Zumindest muß man vermuten, dass hinsichtlich der Magensäfte ein konzentrationsabhängiges Muster des Schädigungsmechanismus bezüglich Apoptose und Nekrose besteht, wobei höhere Konzentrationen eher Apoptose und niedrige Konzentrationen eher Nekrose auszulösen scheinen. Bezüglich der Salzsäure erscheint dagegen das zytotoxische Potential sich deutlicher in Richtung Nekrose zu verschieben, auch wenn die Verdachtsmomente nur durch ein Langzeittestsystem belegt werden können. Insgesamt muss man kritisch beleuchten, dass die festgestellten Effekte relativ gering ausfielen und nur wenige der Messergebnisse eine Signifikanz zeigten. Bei schon erwähnter geringer statistischer Aussagekraft aufgrund der geringen Probenanzahl und der Inhomogenität der Proben müssen die Ergebnisse als Verdachtsmomente interpretiert werden und eher als Orientierung für Folgeversuche dienen. Weiterhin wäre es denkbar, dass die Testsubstanzen zu stark verdünnt wurden. Die Testung mit unverdünntem Magensaft war aufgrund der begrenzten verfügbaren

Menge des Saftes in dieser Arbeit nicht möglich. Wichtig ist anzumerken, dass aufgrund der im Vorversuch dargestellten Pufferwirkung des eingesetzten Mediums die pH-Wert-vermittelte Nekrose/Apoptose weitestgehend ausgeschlossen wurde, da diese nicht Teil der Untersuchungen sein sollte. Ziel war die direkte Zyto- und Genotoxizität der Magensäfte sowie der Salzsäure als Hauptbestandteil derselben ohne Einfluß des pH-Wertes. Dennoch ist die Wirkung des pH-Wertes nicht zu unterschätzen. Bei physiologischen Abläufen wird zwar auch im Gewebe des Ösophagus und Larynx der Magensaft durch Muzinproduktion gepuffert, dennoch treten in-vivo stärkere pH-Wert-Verschiebungen während des Refluxes auf [82, 198].

Hinzu kommt, dass das zeitliche Schädigungsmuster in den Tests nicht der in-vivo auftretenden schwankenden Exposition entspricht [198]. Diesbezüglich konnte mittels zwei der drei Testsysteme zur Beurteilung von Kurzzeitschäden im Zeitintervall von zwei bis drei Stunden der Belastung eine Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoseraten/-indices nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Konzentration der Magensäfte nur bei kurzzeitiger Exposition einen Einfluss auf die Apoptose hat und sich diese Effekte bei Langzeitbelastung nivellieren. Bei den physiologischen pulsatilen Belastungsepisoden könnte dies von Bedeutung sein. Ein entsprechend modifiziertes Belastungsmuster könnte in zukünftigen Tests hier weitere Klarheit bringen.

Zum Anderen könnte von Nachteil sein, dass die Tests methodenbedingt nicht an Ösophagus- oder Larynxepithelien durchgeführt werden konnten. Von Larynxepithelzellen ist bekannt, dass diese sehr sensibel auch auf geringe pH-Wert-Verschiebungen reagieren. So konnte im Tierversuch ein dreimal pro Woche auftretender laryngopharyngealer Reflux Mukosaschäden verursachen [107, 113]. Die laryngopharyngeale Mukosa erscheint im Vergleich zu der des Ösophagus deutlich sensibler, was sich in einer prolongierten Heilungsdauer von bis zu sechs Monaten äußert [114]. Zudem fehlen den Larynxepithelien wichtige Schutzmechanismen, wie die Steigerung der Säure-neutralisierenden Bikarbonatproduktion [115]. Andere Testsysteme oder eine Weiterentwicklung der bestehenden könnten in Zukunft diese Umstände mit berücksichtigen und spezifischere Ergebnisse beitragen.

Ein weiterer Schädigungsmechanismus, welcher durch Verwendung von ex-vivo Tests an Zelllinien nicht erfasst wird und welcher pH-Wert-abhängig ist, ist die Zell-, Epithel- und Gewebeschädigung durch das, im sauren Milieu aktivierte, Pepsin. Die durch Zerstörung des interzellulären Junktionskomplex hervorgerufenen Schäden könnten nur durch in-vivo oder ex-vivo Gewebetests erfasst werden [116].

Der epidemiologische Zusammenhang zwischen Reflux des Magensaftes und Ösophagusadenokarzinom bzw. Larynxkarzinom ist dennoch nachgewiesen [59, 107, 118, 131,

139-142]. Mehrere Autoren postulieren einen chronisch-inflammatorischen Zusammenhang zwischen dem Adenokarzinom des Ösophagus und der Refluxerkrankung. Gestützt wird diese Annahme durch die epidemiologische Beobachtung entartender Barrett-Metaplasien [39, 134]. Die Ergebnisse der Nekrosetestung dieser Arbeit sind nicht in der Lage die Hypothese der entzündlichen Genese zu stützen. Der proinflammatorische Mechanismus des Magensaftes bzw. der Magensäure scheint eher über eine Induktion von Entzündungsmediatoren zu funktionieren. Hierzu existieren Untersuchungen, welche zeigen konnten, dass ein niedriger pH-Wert proinflammatorische Pathways in Geweben aktivieren kann [199]. Ein saures Milieu ruft in Ösophaguszelllinien eine Streßantwort über Induktion von Proliferation und Inflammation sowie Hemmung von Differenzierung hervor [133, 200, 201]. Bei Langzeitexposition, kann es auch zu einer Hemmung der Proliferation und somit zu einer verzögerten Wundheilung kommen [202]. Säureexposition von Ösophaguszellen induziert eines der zentralen inflammatorischen Enzyme - die Zyklooxygenase 2 ebenso wie weitere Schlüsselenzyme, welche auch mit einer inflammatorischen Ösophaguskrebsentstehung in Verbindung gebracht werden [133, 200, 201]. Auch der Krebs-protective Effekt nicht-steroidaler Antirheumatika als Hemmer der Zyklooxygenase-2 lässt eine inflammatorische Genese vermuten [135].

Ylitalo et al. konnten auch in laryngealen Fibroblasten in-vitro eine Säureexpositionszeit-abhängige Veränderung des Genexpressionsmusters diverser Wachstumsfaktoren bzw. proinflammatorischer Gene feststellen, sodass eine entzündliche Genese hier nicht sicher auszuschließen ist [203].

5.3 Ergebnisse der Gentoxizitätsuntersuchungen

5.3.1 Mikrokerntest

Die Untersuchungen der Gentoxizität der fünf Magensäfte als Proben­gruppe mittels Mikrokerntest dieser Studie ergaben zwar eine im Mittel höhere Mikrokernrate als die der Negativkontrolle, konnten jedoch hierbei keine signifikanten Ergebnisse aufzeigen. Dennoch resultieren aus diesem Ergebnis Verdachtsmomente, dass die Magensäfte ein gentoxisches Potential aufweisen und dies schon nach einer Belastung von 24 Stunden. Es zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Apoptose- und Nekrosetestung ein großer interindividueller Unterschied der Gentoxizität zwischen den Einzelproben, was für die Inhomogenität der Proben hinsichtlich deren gentoxischen Potential spricht. Welcher Bestandteil der Magensäfte letztendlich für das Maß der Gentoxizität der einzelnen Proben verantwortlich ist, bleibt anhand der durchgeführten Untersuchungen weiter unklar. Dennoch erscheint der Test hervorragend geeignet interindividuelle Unterschiede zu identifizieren, was eine Applikation als klinisches Testsystem zum Abschätzen des individuellen Krebsrisikos ermöglichen könnte.

Die Ergebnisse der Mikrokernratenbestimmung der Salzsäure verhielten sich ähnlich. Auch hier konnte diese Studie eine, wenn auch nicht signifikant, gesteigerte Gentoxizität im Vergleich zur Negativkontrolle ermitteln. Interessanterweise ließ sich eine signifikante Abhängigkeit der Gentoxizität der Salzsäure von der Belastungszeit nachweisen. So fanden sich schon ab zweiten Tag höhere Werte als die Negativkontrolle und ab dem fünften Tag der Belastung deutlich erhöhte Mikrokernraten. Dies könnte darauf hinweisen, dass die gentoxischen Effekte nach einem langen oder wiederholten Belastungszeitraum zum tragen kommen.

5.3.2 Diskussion der Ergebnisse des Mikrokerntests mit der wissenschaftlichen Literatur

Der Mikrokerntest ist ein kostengünstiges und einfach zu handhabendes Verfahren zur Prüfung der Gentoxizität. Er hat den Vorteil der leichten Wiederholbarkeit. Ihm obliegt der Vorteil der quasi unbegrenzten Zahl auswertbarer Zellen. Zudem ist man mittels dieses Tests in der Lage, den Gesamteinfluss auf die Gentoxizität der schädlichen Noxen zu beurteilen. Die Ergebnisse muss man dennoch kritisch betrachten, da er trotz international anerkannter Kriterien zur Auswertung eine subjektive Betrachtungsweise der Kriterien zugrunde legt.

Die aus dieser Arbeit resultierenden Verdachtsmomente hinsichtlich Gentoxizität werden bestätigt durch die Ergebnisse von Jolly et al. [204]. Die Arbeitsgruppe konnte einen direkt DNA-Schäden-verursachenden Effekt des Magensaftes Expositionszeit-abhängig mittels Comet-

Assay an Ösophaguszelllinien aufzeigen. Hamsterfibroblasten sind zwar eine, für den Mikrokerntest akzeptierte, Standardzelllinie, dennoch ist es auch möglich, dass Larynx- oder Ösophaguszelllinien eine größere Sensibilität gegenüber den Testsubstanzen aufweisen. Ein sekundäres Testverfahren mit gleichem Endpunkt in Kombination zum Mikrokerntest wie z.B. der Comet-Assay könnte dieser Situation Rechnung tragen. In der erwähnten Arbeit von Jolly et al. wurden DNA-Schäden erst durch pH-Werte unter 4,5 verursacht [204]. Da eine pH-Wert-Verschiebung in dieser Arbeit weitestgehend ausgeschlossen wurde, ist es zum einen möglich, dass in den Ergebnissen dieser Arbeit ein anderer gentoxischer Schädigungsmechanismus vorlag oder dass ein geringerer pH-Wert die beobachteten Langzeitschäden zu triggern vermag.

Der protektive Effekt von Protonenpumpeninhibitoren auf die Entartung von Barrett-Metaplasien unterstreicht den negativen Einfluss der pH-Wertverschiebung in den sauren Bereich auf die ösophageale Krebsentstehung [106, 133]. Größer angelegte Folgestudien könnten diesen Sachverhalt gezielt untersuchen.

Beim Larynxkarzinom wird klinisch eher selten vor Entstehung eine chronische Laryngitis beobachtet [164, 165]. Möglicherweise differiert der laryngopharyngeale Mechanismus von dem der ösophagealen Krebsentstehung und die überwiegend diskutierte inflammatorische Komponente tritt in den Hintergrund. Die Verdachtsmomente resultierend aus den Ergebnissen der Gentoxizitätsprüfung sowie die nachweisbaren interindividuellen Unterschiede bestätigen indirekt die Ergebnisse der epidemiologischen Situation. Die große Inhomogenität der einzelnen Magensäfte bei der Untersuchung auf Gentoxizität weist möglicherweise auch auf andere gentoxische Bestandteile des Magensaftes hin. Eventuell sind die Bestandteile des Magensaftes selbst auch nicht die direkten Karzinogene, sondern agieren als Kokarzinogen für andere Substanzen. Adams et al. postulieren anhand ihrer Untersuchungen eine derartige kokarzinogene Wirkung der Magensäure [205]. Sie untersuchten über 18 Wochen an Hamsterwangen die Entstehung maligner Tumoren unter Einfluß von Dimethylbenz-[a]-anthrazen (DMBA), Salzsäure, Pepsin und Salzsäure, DMBA plus Salzsäure sowie DMBA plus Pepsin und Salzsäure. Krebs entwickelte sich nur in Anwesenheit des Karzinogens DMBA, jedoch häufiger in den Gruppen, in welchen mit Salzsäure kombiniert wurde. Für einen kokarzinogenen Effekt von Zigarettenrauchkarzinogenen bei der Entstehung vom ösophagealen Adenokarzinom spricht die erhöhte Risikoreduktion bei Rauchern durch Nahrungsmittel, welche reich an Vitaminen sowie den Spurenelementen Zink und Eisen sind [138].

Die Gruppe in Frage kommender chemischer krebsauslösender Stoffe, die über Lifestylekomponenten, wie Zigaretten-, Alkohol- und Kaffeekonsum, auf die Mukosa des Larynx, Pharynx und Ösophagus einwirken, ist groß. So enthält Zigarettenrauch ca. 61

verschiedene Karzinogene [206]. In geröstetem Kaffee wurden über 1000 verschiedene Chemikalien nachgewiesen, von denen 19 bisher im Tierversuch als karzinogen eingestuft werden konnten [207]. Eine weitere große Gruppe chemischer Noxen ingestiert der Mensch über Nahrungsmittel. Wahrscheinlich ist, in Gewicht und Anzahl, die Mehrheit aller über Nahrungsmittel aufgenommenen Chemikalien natürlicher Herkunft und nur ein kleiner Bruchteil vom Menschen künstlich erzeugt. Dabei sind etwa die Hälfte aller bisher getesteten Nahrungsmittelchemikalien in Tierversuchen in ihrer maximal tolerablen Dosierung krebsauslösend, wobei man davon ausgeht, dass nur etwa 7% der im Tierversuch als krebserregend eingestuften Chemikalien beim Menschen gleichfalls karzinogen wirken [149, 208]. Beim Zubereiten und Erhitzen von Nahrungsmitteln entstehen eine Reihe kanzerogener Stoffe, wobei drei Hauptgruppen zu erwähnen sind: Nitrosamine, formiert aus Stickoxiden, heterozyklische Amine, gebildet aus Aminosäuren und Proteinen und polyzyklische Kohlenwasserstoffe in verkohltem Fleisch [149, 207, 209, 210]. Furfural und ähnliche Furane, geformt aus erhitzten Zuckern, Epoxide bzw. Hydroperoxide sowie ungesättigte Aldehyde aus erhitztem Fett können ebenfalls mutagene Effekte ausüben und auf diese Weise von Bedeutung in laryngopharyngealen oder ösophagealen Krebsentstehung sein [208]. Welche der Substanzen letztendlich am stärksten in Kombination mit dem Magensaftreflux die Entstehung der laryngopharyngeale oder ösophageale Entitäten beeinflusst, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

5.4 Zukünftiger Forschungsbedarf

Da epidemiologische Studien sowohl für das Adenokarzinom des Ösophagus als auch für das laryngopharyngeale Karzinom die gastro- und extraösophageale Refluxerkrankung als unabhängigen Risikofaktor identifizieren konnten und die Inzidenzen der genannten Entitäten steigern, entsteht weiterhin der Bedarf den kausalen Mechanismen auf den Grund zu gehen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich Ansätze für zukünftige Studien:

- Die Überprüfung der aus dieser Arbeit resultierenden Verdachtsmomente mit größerem Probenumfang
- Die Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf Apoptose, Nekrose und Genotoxizität in den in dieser Studie verwendeten Testsystemen.
- Die Untersuchung der Effekte der Magensäfte/Salzsäure in Kombination mit anderen Karzinogenen zur Prüfung der Kokarzinogenität.
- Die Prüfung der Magensäfte/Salzsäure in anderen Konzentrationen (unverdünnt).
- Die Prüfung der Magensäfte/Salzsäure mit prolongierter oder verkürzter Belastungszeit beziehungsweise unterschiedlichen Belastungsmustern.
- Die Prüfung der verwendeten Testsubstanzen in anderen etablierten ex-vivo/in-vitro-Tests, möglicherweise unter Verwendung von Ösophagus- oder laryngopharyngealen Zelllinien oder Geweben.
- Die Prüfung der verwendeten Testsubstanzen in-vivo im Tierversuch mit der Möglichkeit des erweiterten Screenings (Entzündungsparameter, Histologie, Immunhistologie, etc.)
- Die Prüfung der Automatisierbarkeit der angewendeten Testverfahren, speziell des MK-Tests und der FACS-basierten Tests, zur Anwendung als klinisches Testsystem zur Abschätzung des individuellen Krebsentstehungsrisikos von Patientenmagensaft

5.5 Schlussfolgerungen

In Anbetracht der in dieser Studie beobachteten Testergebnisse kann man schlussfolgern, dass nach Kurzzeitbelastung Apoptose ein wesentlicher Schädigungsmechanismus des Magensaftes sowie der Salzsäure als Bestandteil desselben ist. Dieser Sachverhalt erscheint konzentrationsabhängig. Nach längerfristiger Belastung resultieren starke Verdachtsmomente, dass Salzsäure einen Nekrose- und Magensaft einen sowohl Nekrose- als auch Apoptose-induzierenden Effekt hat. Hieraus resultiert wiederum ein gewisses Potential, nach längerer Belastung eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Gentoxische Effekte scheinen zeitabhängig nach Langzeitbelastung aufzutreten. Hierfür sprechen Verdachtsmomente resultierend sowohl aus der Magensaft- als auch der Salzsäuretestung. Anhand der Ergebnisse muss man postulieren, dass weitere Bestandteile der Magensäfte möglicherweise verantwortlich für die gentoxischen Effekte sind. Insgesamt ist dem Magensaft und der Salzsäure mehr als ein Schädigungsmechanismus zuzuschreiben, wobei die Art und das Ausmaß der Schädigung zeit- und konzentrationsabhängig zu sein scheinen. Somit kommt die chronische Exposition des Magensaftes als maßgebliches kanzerogenes Moment für den pharyngolaryngoösophagealen Gastrointestinaltrakt in Frage. Darüber hinaus eignen sich möglicherweise die dargestellten Testsysteme zum Screening, also zur Abschätzung des individuellen Risikos der Entstehung refluxassoziierter Entitäten. Vor allem die FACS-basierten Tests wären leicht in die klinische Labordiagnostik übertragbar, da das FACS-Verfahren automatisierbar und in der klinisch-immunologischen Diagnostik bereits etabliert ist.

Weiterreichende Studien hinsichtlich des Einflusses unterschiedlicher Belastungsmuster, der Kokarzinogenität des Magensaftes sowie der Salzsäure mit einer größeren Zahl an Proben sind notwendig, um die aus dieser Arbeit resultierenden Fragen zu klären.

6. Zusammenfassung

Trotz jahrzehntelanger Bemühungen, ist es bisher nur teilweise gelungen, die komplexen Abläufe der Krebsentstehung zu verstehen. Das Mehrstufenmodell der Kanzerogenese ist weitestgehend wissenschaftlich akzeptiert. Hierbei kommt es in mehreren Schritten zuzüglich zu möglicherweise vererbten Mutationen zum Anhäufen (epi-)genetischer Veränderungen in v.a. zellteilungsregulierenden und -kontrollierenden oder DNA-Reparaturgenen. Es resultiert eine vom Organismus sich unkontrolliert teilende Zelle. Die so entstehende Zellmasse überwindet Wachstumsbarrieren, kann Angiogenese induzieren und eventuell Fernabsiedlungen ausbilden. Ergebnisse von Studien der letzten Jahre legen darüber hinaus nahe, dass inflammatorische Prozesse in der Krebsentstehung eine unterhaltende, begünstigende und auch initiative Wirkung haben. Entzündungen können hierbei aus biologischen, chemischen und physikalischen Noxen resultieren. Im oberen Respirations- und Gastrointestinaltrakt sind in den letzten Jahrzehnten trotz zum Teil sinkendem Nikotin- und Alkoholkonsum deutlich steigende Raten des Larynxkarzinoms sowie des Adenokarzinoms des Ösophagus beobachtet worden. Epidemiologische Studien konnten eine Schädigung durch Magensaft in Form von gastro- und extraösophagealem Reflux als unabhängigen Risikofaktor identifizieren. Anhand der derzeitigen Studienlage jedoch bleibt unklar, welcher Schädigungsmechanismus hierbei zum Tragen kommt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es anhand unterschiedlicher in-vitro Testsysteme pH-Wert unabhängig sowohl das genotoxische als auch das zytotoxische Potential des Magensaftes zu untersuchen. Im Rahmen der Zytotoxizitätstests sollte hierbei zwischen entzündungsinduzierender Nekrose und verschiedenen Endpunkten der Apoptose differenziert werden.

Es wurden von fünf gesunden Patienten gastroscopisch Magensaftproben gewonnen. Diese Magensaftproben ebenso wie 0,1 N Salzsäure als Hauptbestandteil des Magensaftes wurden in den Konzentrationen 1:10, 1:20 und 1:40 in fünf unterschiedlichen Tests auf Zytotoxizität geprüft. Zur Differenzierung zwischen Apoptose- und Nekroserate kamen der Propidiumjodidtest, der Mitochondrienmembranpotentialtest und der Annexintest zur Anwendung. CDD⁺-ELISA und der Caspaseassay dienten allein der Bestimmung des Apoptosepotentials. Außer dem CDD⁺-ELISA sind alle angewandten Testsysteme FACS-basiert. Der Propidiumjodidtest und der Mitochondrienmembranpotentialtest bezogen sich, bedingt durch den Zielpunkt der Tests in der Apoptosekaskade, auf langfristige Belastungszeiträume von 24 Stunden (MMP auch 48 Stunden und nur Magensaft), während mittels der übrigen Testsysteme kurzfristige Belastungszeiträume von zwei bis drei Stunden analysiert wurden. Zur Untersuchung der Genotoxizität von Magensaft und Salzsäure kam der Mikrokerneltest zum Einsatz. Die Mikrokernelrate der Salzsäure wurde über

acht Tage Belastung untersucht um mögliche Langzeitwirkungen aufzudecken. Die Belastung mit den fünf Magensäften erfolgte über 24 Stunden.

Aus den Zytotoxizitätstests resultieren starke Verdachtsmomente, dass Magensaft nach Kurzzeitbelastung in der Lage ist, die Apoptose zu steigern (Annexintest, CDD⁺-ELISA), ohne einen entsprechenden Einfluss auf die Nekrose auszuüben. Im Caspasetest war dieses Ergebnis für die Konzentration 1:10 signifikant ($p=0,044$). Der Effekt erscheint konzentrationsabhängig, sodass eine höhere Konzentration in einer stärker ausgeprägten Apoptose resultiert (Annexin-Test $p=0,042$; Caspasetest $p=0,012$.) Nach Langzeitbelastung mit Magensaft resultieren ebenfalls Verdachtsmomente, jedoch keine signifikanten Ergebnisse einer Erhöhung von Apoptose und Nekrose (Propidiumjodidtest: Konzentrationen 1:10 erhöhte Apoptose, 1:40 erhöhte Nekrose nach 24 Stunden; MMP-Test: erhöhte Nekrose nach 24 Stunden). Signifikante interindividuelle Unterschiede waren in den Zytotoxizitätstests nicht festzustellen. Nach Kurzzeitbelastung mit Salzsäure resultieren ebenfalls Verdachtsmomente einer gesteigerten Apoptose (Annexintest, Caspasetest) nicht jedoch der Nekrose. Dieses Ergebnis war im CDD⁺-ELISA in den Konzentrationen 1:5 ($p=0,002$) und 1:10 ($p=0,041$) signifikant. Nach Langzeitbelastung resultieren Verdachtsmomente einer Nekroseinduktion (Propidiumjodidtest). Die Ergebnisse der Salzsäuretests waren nicht konzentrationsabhängig. In der Gentoxizitätsprüfung nach 24 Stunden zeigen die Magensäfte signifikant inhomogene (Magensaft (MS) 2 versus MS1 $p=0,016$, MS4 $p=0,045$, MS5 $p=0,027$) und zum Teil deutlich gesteigerte Mikrokernraten. Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle war dennoch nicht nachzuweisen. Die Gentoxizitätsprüfung der Salzsäure zeigt eine belastungszeitabhängige ($p=0,001$) Steigerung der MK-Rate ab dem zweiten Tag mit einem Maximum nach fünf Tagen jedoch ohne Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle. Hieraus resultiert ein entsprechendes Verdachtsmoment der Gentoxizität.

Dies ist die erste Studie, welche pH-Wert-unabhängige Schädigungsmechanismen des Magensaftes und somit dessen Rolle in der Kanzerogenese des oberen Gastrointestinaltraktes beleuchtet. Trotz der geringen Probenzahl konnten wir eine konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion nach Kurzzeitbelastung nachweisen. Hinsichtlich der Langzeitbelastung bestehen starke Verdachtsmomente einer Apoptose- und Nekroseinduktion sowie einer belastungszeitabhängig gesteigerten direkten Gentoxizität. Anhand der Ergebnisse wird es möglich, größer angelegte Studien zu planen sowie in naher Zukunft diagnostische, FACS-basierte Routineverfahren zur individuellen Risikoabschätzung der Krebsentstehung im oberen Gastrointestinaltrakt zu entwickeln. Durch Aufdecken der potentiell reversiblen Schädigungsmechanismen wird es zudem möglich, neue Therapiestrategien zu entwickeln.

7. Literaturverzeichnis

1. WHO, IARC. World Cancer Report, ed. Steward BW, Kleihues P. 2003, Lyon: IARCPress. 351.
2. Schmitz-Moorman P, Gebert G, Thomas C, et al. Allgemeine Pathologie., in Pathologie., Thomas C, Editor. 1995, Schattauer Verlag: Stuttgart. 161-188.
3. Jones PA. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 983: 213-9.
4. Kassen A, Hofmockel G. [Molecular genetic and cell biology principles for the development of malignant tumors]. *Urologe A*, 2000, 39(3): 214-21.
5. Funk JO, Kind P. [Cell cycle control, genetic instability and cancer]. *Hautarzt*, 1997, 48(3): 157-65.
6. Pfeifer GP. p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res*, 2000, 450(1-2): 155-66.
7. Loeb LA. Endogenous carcinogenesis: molecular oncology into the twenty-first century--presidential address. *Cancer Res*, 1989, 49(20): 5489-96.
8. Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1972, 11(19): 3610-8.
9. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(17): 7915-22.
10. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 379-85.
11. Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3230-9.
12. Jackson AL, Loeb LA. The mutation rate and cancer. *Genetics*, 1998, 148(4): 1483-90.
13. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1999, 20(4): 519-27.
14. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(2): 185-91.
15. Anders A, Anders F, Zechel C, Schleenbecker U, Smith A. [Attempts at analyzing the initiation of the initial processes of carcinogenesis based on the Xiphophorus melanoma model]. *Arch Geschwulstforsch*, 1990, 60(4): 249-63.
16. Ahn SH, Hwang UK, Kwak BS, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in Korean breast cancer patients. *J Korean Med Sci*, 2004, 19(2): 269-74.

17. Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, et al. Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(15): 2215-21.
18. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Jr., Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001, 10(2): 83-7.
19. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. 1954. *Int J Epidemiol*, 2004, 33(6): 1174-9.
20. Cohen SM, Ellwein LB. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res*, 1991, 51(24): 6493-505.
21. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61(5): 759-67.
22. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1(2): 157-62.
23. Luebeck EG, Moolgavkar SH. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(23): 15095-100.
24. Berenblum I, Shubik P. The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene. *Br J Cancer*, 1949, 3(3): 384-6.
25. Trosko JE, Chang CC, Medcalf A. Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest*, 1983, 1(6): 511-26.
26. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci*, 1998, 3: d208-36.
27. Fischer AH, Young KA, DeLellis RA. Incorporating pathologists' criteria of malignancy into the evolutionary model for cancer development. *J Cell Biochem*, 2004, 93(1): 28-36.
28. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res*, 1996, 56(11): 2484-7.
29. Bronchud MH. Is cancer really a 'local' cellular clonal disease? *Med Hypotheses*, 2002, 59(5): 560-5.
30. Chow M, Rubin H. Clonal selection versus genetic instability as the driving force in neoplastic transformation. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6510-8.
31. Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6212-20.
32. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, et al. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16226-31.

33. Aranda-Anzaldo A. Cancer development and progression: a non-adaptive process driven by genetic drift. *Acta Biotheor*, 2001, 49(2): 89-108.
34. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog*, 2000, 29(4): 205-11.
35. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med*, 2000, 248(3): 171-83.
36. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, 357(9255): 539-45.
37. Ekblom A. Risk of cancer in ulcerative colitis. *J Gastrointest Surg*, 1998, 2(4): 312-3.
38. Pisani P, Parkin DM, Munoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997, 6(6): 387-400.
39. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56(2): 69-83.
40. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 195(3): 298-308.
41. Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2002, 18(6): 294-302.
42. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RS. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol*, 2002, 146(5): 810-5.
43. Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, et al. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *Embo J*, 2000, 19(24): 6742-50.
44. Liu MY, Shih YY, Li LY, et al. Expression of the Epstein-Barr virus BHRF1 gene, a homologue of Bcl-2, in nasopharyngeal carcinoma tissue. *J Med Virol*, 2000, 61(2): 241-50.
45. Alexander FE, Lawrence DJ, Freeland J, et al. An epidemiologic study of index and family infectious mononucleosis and adult Hodgkin's disease (HD): evidence for a specific association with EBV+ve HD in young adults. *Int J Cancer*, 2003, 107(2): 298-302.
46. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(23): 1772-83.
47. Melbye M, Frisch M. The role of human papillomaviruses in anogenital cancers. *Semin Cancer Biol*, 1998, 8(4): 307-13.

48. Tanaka K, Hirohata T, Koga S, et al. Hepatitis C and hepatitis B in the etiology of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *Cancer Res*, 1991, 51(11): 2842-7.
49. Lifson AR, Darrow WW, Hessel NA, et al. Kaposi's sarcoma in a cohort of homosexual and bisexual men. Epidemiology and analysis for cofactors. *Am J Epidemiol*, 1990, 131(2): 221-31.
50. Clarke CA, Glaser SL. Epidemiologic trends in HIV-associated lymphomas. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13(5): 354-9.
51. Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol*, 2002, 3(2): 97-104.
52. Peek RM, Jr., Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 28-37.
53. Sithithaworn P, Haswell-Elkins MR, Mairiang P, et al. Parasite-associated morbidity: liver fluke infection and bile duct cancer in northeast Thailand. *Int J Parasitol*, 1994, 24(6): 833-43.
54. Lim MK, Ju YH, Franceschi S, et al. Clonorchis sinensis infection and increasing risk of cholangiocarcinoma in the Republic of Korea. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 75(1): 93-6.
55. Badawi AF, Mostafa MH, Probert A, O'Connor PJ. Role of schistosomiasis in human bladder cancer: evidence of association, aetiological factors, and basic mechanisms of carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*, 1995, 4(1): 45-59.
56. Friedman S. Cancer in Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(3): 621-39.
57. Platz EA, De Marzo AM. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *J Urol*, 2004, 171(2 Pt 2): S36-40.
58. Tazuma S, Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesions of the gall bladder. The impact of chronic inflammation and gallstones. *Langenbecks Arch Surg*, 2001, 386(3): 224-9.
59. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 1999, 340(11): 825-31.
60. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol*, 1999, 149(1): 13-20.
61. Prindiville SA, Byers T, Hirsch FR, et al. Sputum cytological atypia as a predictor of incident lung cancer in a cohort of heavy smokers with airflow obstruction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12(10): 987-93.
62. Steinmaus C, Balmes JR. Government laboratory worker with lung cancer: comparing risks from beryllium, asbestos, and tobacco smoke. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(10): 1003-6.
63. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-7.

64. Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2(2): 90-7; quiz 1 p following 113.
65. O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer*, 2001, 85(4): 473-83.
66. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, 63(7): 854-65.
67. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 2000, 103(3): 481-90.
68. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996, 383(6603): 787-93.
69. Cordon-Cardo C, Prives C. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med*, 1999, 190(10): 1367-70.
70. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986, 315(26): 1650-9.
71. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
72. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(10): 749-59.
73. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res*, 1990, 50(23): 7415-21.
74. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, 2002, 347(20): 1593-603.
75. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(7): 540-50.
76. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*, 1992, 13(7): 265-70.
77. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol*, 2004, 164(4): 1131-9.
78. Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*, 2000, 164(2): 762-7.
79. Gu L, Tseng S, Horner RM, et al. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, 2000, 404(6776): 407-11.
80. Nickoloff BJ, Ben-Neriah Y, Pikarsky E. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J Invest Dermatol*, 2005, 124(6): x-xiv.
81. Holloway RH, Hongo M, Berger K, McCallum RW. Gastric distention: a mechanism for postprandial gastroesophageal reflux. *Gastroenterology*, 1985, 89(4): 779-84.

82. Tobey NA, Powell DW, Schreiner VJ, Orlando RC. Serosal bicarbonate protects against acid injury to rabbit esophagus. *Gastroenterology*, 1989, 96(6): 1466-77.
83. Bremner RM, Hoefft SF, Costantini M, et al. Pharyngeal swallowing. The major factor in clearance of esophageal reflux episodes. *Ann Surg*, 1993, 218(3): 364-9; discussion 369-70.
84. Fox M, Forgacs I. Gastro-oesophageal reflux disease. *Bmj*, 2006, 332(7533): 88-93.
85. Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*, 1997, 112(5): 1448-56.
86. Nebel OT, Fornes MF, Castell DO. Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitating factors. *Am J Dig Dis*, 1976, 21(11): 953-6.
87. Koufman JA, Aviv JE, Casiano RR, Shaw GY. Laryngopharyngeal reflux: position statement of the committee on speech, voice, and swallowing disorders of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002, 127(1): 32-5.
88. Hicks DM, Ours TM, Abelson TI, Vaezi MF, Richter JE. The prevalence of hypopharynx findings associated with gastroesophageal reflux in normal volunteers. *J Voice*, 2002, 16(4): 564-79.
89. Shaker R, Milbrath M, Ren J, et al. Esophagopharyngeal distribution of refluxed gastric acid in patients with reflux laryngitis. *Gastroenterology*, 1995, 109(5): 1575-82.
90. Altman KW, Stephens RM, Lyttle CS, Weiss KB. Changing impact of gastroesophageal reflux in medical and otolaryngology practice. *Laryngoscope*, 2005, 115(7): 1145-53.
91. Cho YS, Choi MG, Jeong JJ, et al. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Asan-si, Korea. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(4): 747-53.
92. Cameron AJ, Lagergren J, Henriksson C, et al. Gastroesophageal reflux disease in monozygotic and dizygotic twins. *Gastroenterology*, 2002, 122(1): 55-9.
93. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*, 2005, 54(5): 710-7.
94. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(1): 190-200.
95. Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(8): 1901-9.
96. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, et al. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut*, 2002, 50(4): 451-9.

97. Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 17(4): 537-45.
98. Locke GR, 3rd, Zinsmeister AR, Fett SL, Melton LJ, 3rd, Talley NJ. Overlap of gastrointestinal symptom complexes in a US community. *Neurogastroenterol Motil*, 2005, 17(1): 29-34.
99. Fass R, Hell RW, Garewal HS, et al. Correlation of oesophageal acid exposure with Barrett's oesophagus length. *Gut*, 2001, 48(3): 310-3.
100. Castell DO, Kahrilas PJ, Richter JE, et al. Esomeprazole (40 mg) compared with lansoprazole (30 mg) in the treatment of erosive esophagitis. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(3): 575-83.
101. Rex DK, Cummings OW, Shaw M, et al. Screening for Barrett's esophagus in colonoscopy patients with and without heartburn. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1670-7.
102. Pandolfino JE, Shi G, Curry J, et al. Esophagogastric junction distensibility: a factor contributing to sphincter incompetence. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(6): G1052-8.
103. Lipan MJ, Reidenberg JS, Laitman JT. Anatomy of reflux: a growing health problem affecting structures of the head and neck. *Anat Rec B New Anat*, 2006, 289(6): 261-70.
104. Sifrim D. Relevance of volume and proximal extent of reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*, 2005, 54(2): 175-8.
105. Trudgill NJ, Riley SA. Transient lower esophageal sphincter relaxations are no more frequent in patients with gastroesophageal reflux disease than in asymptomatic volunteers. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(9): 2569-74.
106. Field SK, Sutherland LR. Does medical antireflux therapy improve asthma in asthmatics with gastroesophageal reflux?: a critical review of the literature. *Chest*, 1998, 114(1): 275-83.
107. Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope*, 1991, 101(4 Pt 2 Suppl 53): 1-78.
108. Koufman JA, Amin MR, Panetti M. Prevalence of reflux in 113 consecutive patients with laryngeal and voice disorders. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 123(4): 385-8.
109. Grossi L, Ciccaglione AF, Marzio L. Transient lower oesophageal sphincter relaxations play an insignificant role in gastro-oesophageal reflux to the proximal oesophagus. *Neurogastroenterol Motil*, 2001, 13(5): 503-9.
110. Knight RE, Wells JR, Parrish RS. Esophageal dysmotility as an important co-factor in extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux. *Laryngoscope*, 2000, 110(9): 1462-6.

111. Postma GN, Tomek MS, Belafsky PC, Koufman JA. Esophageal motor function in laryngopharyngeal reflux is superior to that in classic gastroesophageal reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110(12): 1114-6.
112. Aviv JE, Liu H, Parides M, Kaplan ST, Close LG. Laryngopharyngeal sensory deficits in patients with laryngopharyngeal reflux and dysphagia. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2000, 109(11): 1000-6.
113. Little FB, Koufman JA, Kohut RI, Marshall RB. Effect of gastric acid on the pathogenesis of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1985, 94(5 Pt 1): 516-9.
114. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. Laryngopharyngeal reflux symptoms improve before changes in physical findings. *Laryngoscope*, 2001, 111(6): 979-81.
115. Johnston N, Knight J, Dettmar PW, Lively MO, Koufman J. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope*, 2004, 114(12): 2129-34.
116. Axford SE, Sharp N, Ross PE, et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: preliminary studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110(12): 1099-108.
117. Gill GA, Johnston N, Buda A, et al. Laryngeal epithelial defenses against laryngopharyngeal reflux: investigations of E-cadherin, carbonic anhydrase isoenzyme III, and pepsin. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2005, 114(12): 913-21.
118. Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin Radiat Oncol*, 2007, 17(1): 2-9.
119. Assimakopoulos D, Patrikakos G. The role of gastroesophageal reflux in the pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol*, 2002, 23(6): 351-7.
120. Helm JF. Role of saliva in esophageal function and disease. *Dysphagia*, 1989, 4(2): 76-84.
121. Helm JF. Esophageal acid clearance. *J Clin Gastroenterol*, 1986, 8 Suppl 1: 5-11.
122. Orlando RC. Esophageal epithelial resistance. *J Clin Gastroenterol*, 1986, 8 Suppl 1: 12-6.
123. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, Parkin DM. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer*, 2002, 99(6): 860-8.
124. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Jama*, 1991, 265(10): 1287-9.
125. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am*, 2002, 11(2): 235-56.

126. Heitmiller RF, Sharma RR. Comparison of prevalence and resection rates in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996, 112(1): 130-6.
127. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer*, 1998, 83(10): 2049-53.
128. Yang PC, Davis S. Incidence of cancer of the esophagus in the US by histologic type. *Cancer*, 1988, 61(3): 612-7.
129. Powell J, McConkey CC, Gillison EW, Spychal RT. Continuing rising trend in oesophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2002, 102(4): 422-7.
130. Lambert R. Upper gastrointestinal tumors. *Endoscopy*, 2006, 38(2): 133-6.
131. Cameron AJ, Romero Y. Symptomatic gastro-oesophageal reflux as a risk factor for oesophageal adenocarcinoma. *Gut*, 2000, 46(6): 754-5.
132. Shaheen NJ, Crosby MA, Bozymski EM, Sandler RS. Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology*, 2000, 119(2): 333-8.
133. Ouatu-Lascar R, Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Differentiation and proliferation in Barrett's esophagus and the effects of acid suppression. *Gastroenterology*, 1999, 117(2): 327-35.
134. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol*, 1999, 154(4): 965-73.
135. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 2003, 124(1): 47-56.
136. Brown LM, Swanson CA, Gridley G, et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(2): 104-9.
137. Chen H, Tucker KL, Graubard BI, et al. Nutrient intakes and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Nutr Cancer*, 2002, 42(1): 33-40.
138. Terry P, Lagergren J, Ye W, Wolk A, Nyren O. Inverse association between intake of cereal fiber and risk of gastric cardia cancer. *Gastroenterology*, 2001, 120(2): 387-91.
139. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009. [cited 2009-07-10]; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/.
140. Copper MP, Smit CF, Stanojcic LD, et al. High incidence of laryngopharyngeal reflux in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*, 2000, 110(6): 1007-11.
141. Freije JE, Beatty TW, Campbell BH, et al. Carcinoma of the larynx in patients with gastroesophageal reflux. *Am J Otolaryngol*, 1996, 17(6): 386-90.

142. Mercante G, Bacciu A, Ferri T, Bacciu S. Gastroesophageal reflux as a possible co-promoting factor in the development of the squamous-cell carcinoma of the oral cavity, of the larynx and of the pharynx. *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 2003, 57(2): 113-7.
143. Cann CI, Fried MP, Rothman KJ. Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am*, 1985, 18(3): 367-88.
144. Wynder EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Res*, 1977, 37(12): 4608-22.
145. Centers for Disease Control and Prevention. Tobacco use - United States, 1900-1999. . 1999, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 986-93.
146. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001. 2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD
147. Falk RT, Pickle LW, Brown LM, et al. Effect of smoking and alcohol consumption on laryngeal cancer risk in coastal Texas. *Cancer Res*, 1989, 49(14): 4024-9.
148. Zeka A, Gore R, Kriebel D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta-regression analysis. *Cancer Causes Control*, 2003, 14(9): 897-906.
149. IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to human. 1972-2005, International Agency of Risk on Cancer: Lyon.
150. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 121(2): 157-60.
151. Goolden AW. Radiation cancer: a review with special reference to radiation tumours in the pharynx, larynx, and thyroid. *Br J Radiol*, 1957, 30(360): 626-40.
152. Maier H, Tisch M, Enderle G, Dietz A, Weidauer H. [Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract]. *Hno*, 1997, 45(11): 905-8.
153. Morrison MD. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma? *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1988, 99(4): 370-3.
154. Qadeer MA, Colabianchi N, Vaezi MF. Is GERD a risk factor for laryngeal cancer? *Laryngoscope*, 2005, 115(3): 486-91.
155. Franceschi S, Levi F, La Vecchia C, et al. Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer*, 1999, 83(1): 1-4.
156. Talamini R, La Vecchia C, Levi F, et al. Cancer of the oral cavity and pharynx in nonsmokers who drink alcohol and in nondrinkers who smoke tobacco. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(24): 1901-3.
157. Dennish GW, Castell DO. Inhibitory effect of smoking on the lower esophageal sphincter. *N Engl J Med*, 1971, 284(20): 1136-7.

158. Kaufman SE, Kaye MD. Induction of gastro-oesophageal reflux by alcohol. *Gut*, 1978, 19(4): 336-8.
159. Smit CF, Copper MP, van Leeuwen JA, Schoots IG, Stanojcic LD. Effect of cigarette smoking on gastropharyngeal and gastroesophageal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110(2): 190-3.
160. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: causation or association? A critical review. *Am J Otolaryngol*, 2006, 27(2): 119-28.
161. Enberg N, Alho H, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001, 92(3): 292-8.
162. Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Med*, 1999, 106(6): 642-9.
163. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol*, 2001, 96(7): 2013-8.
164. Gabriel CE, Jones DG. The importance of chronic laryngitis. *J Laryngol Otol*, 1960, 74: 349-57.
165. Glanz H, Kleinsasser O. [Chronic laryngitis and carcinoma (author's transl)]. *Arch Otorhinolaryngol*, 1976, 212(1): 57-75.
166. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 3-15.
167. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, Murakami T. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum Cell*, 1998, 11(1): 3-12.
168. Cohen SM. Cell proliferation and carcinogenesis. *Drug Metab Rev*, 1998, 30(2): 339-57.
169. Moolgavkar SH, Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 1981, 66(6): 1037-52.
170. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 485-95.
171. Dragan YP, Bidlack WR, Cohen SM, et al. Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: fumonisin B(1) as an example. *Toxicol Sci*, 2001, 61(1): 6-17.
172. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 2006, 600(1-2): 37-45.
173. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 1977, 19(5): 621-6.

174. Ibelgaufts H. U937. Horst Ibelgaufts' COPE: Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia 2007 01-27-2008 [cited 2008 06-22-08]; Available from: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=U937>.
175. Van Aken H, Rolf N. [Preoperative evaluation and preparation. The view of the anesthetist]. *Anaesthesist*, 1997, 46 Suppl 2: S80-4.
176. Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki: Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen Weltärztebund 2000 [cited; 104-8 (Epub)]. Available from: <http://www.bundesärztekammer.de/30/Auslandsdienst/92Helisinki2002.pdf>.
177. Salzman GC, Singham SB, Johnston RG, Bohren CF. Light scattering and cytometry. , in *Flow Cytometry and Sorting*, Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML, Editors. 1990, Wiley-Liss: New York. 81-107.
178. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1995, 182(5): 1597-601.
179. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991, 139(2): 271-9.
180. Omura S, Iwai Y, Hirano A, et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 1977, 30(4): 275-82.
181. Castedo M, Hirsch T, Susin SA, et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, 1996, 157(2): 512-21.
182. Jelley EE. Molecular, nematic and crystal states of 1:1ϕ-diethyl-cyanine chloride. *Nature (Lond.)*, 1937, 139: 631-632.
183. Troiano L, Ferraresi R, Lugli E, et al. Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry. *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 2719-27.
184. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992, 148(7): 2207-16.
185. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1): 39-51.
186. Li X, Darzynkiewicz Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif*, 1995, 28(11): 571-9.
187. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 1999, 6(11): 1028-42.

188. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(25): 14486-91.
189. Jayaraman S. Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry A*, 2003, 56(2): 104-12.
190. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 2000, 455(1-2): 81-95.
191. Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT. Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 27(3): 176-84.
192. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res*, 2002, 1(3): 246-60.
193. Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol*, 1959, 1: 216-29.
194. Heddle JA, Carrano AV. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat Res*, 1977, 44(1): 63-9.
195. Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. Clinical experience with the micronucleus assay. *J Cell Biochem Suppl*, 1993, 17F: 206-12.
196. Bloching M, Hofmann A, Berghaus A, Lautenschlager C, Grummt T. [Micronuclei as biological markers for the detection of local cancer transformation in the upper aerodigestive tract]. *Hno*, 2000, 48(6): 444-50.
197. Belien JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis*, 1995, 16(10): 2395-400.
198. Hu WH, Wong NY, Lai KC, et al. Normal 24-hour ambulatory proximal and distal gastroesophageal reflux parameters in Chinese. *Hong Kong Med J*, 2002, 8(3): 168-71.
199. O'Toole D, Abdel-Latif MM, Long A, et al. Low pH and *Helicobacter pylori* increase nuclear factor kappa B binding in gastric epithelial cells: a common pathway for epithelial cell injury? *J Cell Biochem*, 2005, 96(3): 589-98.
200. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Altered sodium-hydrogen exchange activity is a mechanism for acid-induced hyperproliferation in Barrett's esophagus. *Am J Physiol*, 1998, 275(1 Pt 1): G47-55.
201. Souza RF, Shewmake K, Terada LS, Spechler SJ. Acid exposure activates the mitogen-activated protein kinase pathways in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 2002, 122(2): 299-307.

202. Jimenez P, Lanas A, Piazuolo E, Esteva F. Effects of extracellular pH on restitution and proliferation of rabbit oesophageal epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(4): 545-52.
203. Ylitalo R, Baugh A, Li W, Thibeault S. Effect of acid and pepsin on gene expression in laryngeal fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2004, 113(11): 866-71.
204. Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis*, 2004, 19(4): 319-24.
205. Adams J, Heintz P, Gross N, et al. Acid/pepsin promotion of carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000, 126(3): 405-9.
206. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(6): 473-86.
207. Gold LS, Slone TS, Ames BN, eds. Publications from the Carcinogenic Potency Project: Priorization of Possible Carcinogenic Hazards in Food. *Food Chemical Risk Analysis*, ed. Tennant DR. 1997, Chapman and Hall: New York. pp. 267-295.
208. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(12): 5258-65.
209. Chen YC, Chen BH. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fumes from fried chicken legs. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(14): 4162-7.
210. Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett*, 1995, 93(1): 17-48.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Patrick Strube, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vitro Untersuchungen des zytotoxischen und gentoxischen Potentials von humanen Magensäften als Grundlage der Krebsentstehung des oberen Gastrointestinaltraktes.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

20.07.2009

Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn PD Dr. B. Sedlmaier für die Überlassung des Promotionsthemas, für die kritischen Hinweise und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Dem ehemaligen Leiter der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) für Vermittlung, ausdauernde Kooperation und Bereitstellung der Magensaftuntersuchungsproben.

Den Mitarbeitern der Forschungsstelle des Umweltbundesamtes in Bad Elster für die großzügige Gewährung der Arbeitsbedingungen und wissenschaftliche Anleitung. Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. T. Grummt für die langjährige ausdauernde Betreuung, methodische Unterstützung, die kritischen Hinweise sowie für Lösungshilfe bei Problemen.

Meiner Freundin Katrin Müller, für dauerhaftes Verständnis und moralische Unterstützung.