

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede**

**Die Bedeutung der bakteriellen Besiedelung bei der Pathogenese
des Adenokarzinoms der Speiseröhre**

Experimentelle Untersuchung am Refluxmodell der Ratte

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Dominik Wittmann
aus Amberg

Würzburg, Februar 2002

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Fein

Korreferent: Prof. Dr. med. K.-H. Fuchs

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2002

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODIK	5
2.1 VERSUCHSREIHEN	5
2.2 DURCHFÜHRUNG DER OP	7
2.3 AUTOPSIE	10
2.4 HISTOLOGIE	10
2.5 BAKTERIEN	11
2.6 NITROSOGALLENSÄUREN	12
2.7 GENTOXIZITÄT	15
2.8 STATISTIK	16
3. ERGEBNISSE	17
3.1 ALLGEMEIN	17
3.2 HISTOLOGIE	18
3.3 BAKTERIEN	21
3.4 NITROSOGALLENSÄUREN	24
3.5 GENTOXIZITÄT	26
3.6 BEANTWORTUNG DER FRAGEN	28
4. DISKUSSION	30
5. ZUSAMMENFASSUNG	35
6. LITERATUR	36

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1. Einleitung

In den vergangenen 15 Jahren hat sich die Inzidenz der malignen Speiseröhrentumore vervielfacht¹. Die Ösophaguskarzinome werden histologisch in zwei verschiedene Hauptarten unterteilt: das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Während das bis dato weitaus häufigere Plattenepithelkarzinom eher im oberen beziehungsweise mittleren Drittel des Ösophagus zu finden ist und vor allem durch Rauchen und übermäßigen Alkoholkonsum induziert wird, tritt das Adenokarzinom in der Regel magennah auf und stellt oft die Komplikation einer Refluxkrankheit² dar. Der beobachtete Inzidenzanstieg ist nahezu alleine auf die vermehrte Entstehung von Adenokarzinomen zurückzuführen, die heutzutage bereits in einer Relation von 3:1 zum früher häufigeren Plattenepithelkarzinom vorkommen³. In Europa und Nordamerika weist dieser Tumor die größte Zunahme der Inzidenz auf und wird beim Häufigkeitszuwachs aller Krebsarten in Industrieländern nur vom malignen Melanom übertroffen⁴.

Die genauen Gründe für diesen dramatischen Anstieg sind noch nicht genau geklärt. Bekannt ist jedoch, daß das Vorhandensein von spezialisierten, intestinalen Zylinderepithelmetaplasien in der Speiseröhre (sogenannter Barrett-Ösophagus) eine Präkanzerose darstellt und eng mit einer Erhöhung der Adenokarzinomentstehung verbunden ist^{2,5}. Häufig entwickeln sich die Tumore über eine Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz². Der Barrett-Ösophagus, der gegenwärtig bei Nachweis von spezialisiertem, intestinalen Zylinderepithel beliebiger Länge diagnostiziert wird, entsteht als Folge einer chronischen Schleimhautschädigung im Rahmen einer Refluxösophagitis und ist somit eine erworbene Erkrankung⁶⁻⁸. Aufgrund des 30- bis 125-fach erhöhten Risikos^{2,5} einer Karzinomentstehung wird bei der Diagnose eines Barrett-Ösophagus ein regelmäßiges gastrokopisches Screening empfohlen⁹. In vielen Zentren wird auch eine Ablation des Barrett-Epithels mit Laserkoagulation oder photodynamischer Therapie durchgeführt. Nach der Ablation ist eine medikamentöse oder operative Reduktion des Refluxes erforderlich, damit beim Ausheilen der Ösophagusschleimhaut Plattenepithel und nicht erneut Barrett-Epithel entsteht^{10,11}, was als ein deutlicher Hinweis auf die ätiologische Bedeutung des gastroösophagealen Refluxes für die Entstehung des Barrett-Ösophagus zu werten ist.

Der gastroösophageale Reflux setzt sich zusammen aus dem Magensaft, der vor allem aus Säure und Pepsin besteht, und dem Duodenalsaft, der beispielsweise Gallensalze und

Pankreasenzyme enthält. Der Reflux von Magensaft führt dabei zu einer Ösophagitis^{12,13}. Der zusätzliche Reflux von Duodenalsaft verstärkt weiterhin das Ausmaß der Mukosaschädigung und wirkt synergistisch, was mittlerweile sowohl in klinischen Studien¹⁴⁻¹⁸ wie auch in Tierexperimenten¹⁹⁻²⁴ mehrfach reproduziert werden konnte. Die erhöhte Exposition der Speiseröhre mit Duodenalsaft könnte auch einen Schlüsselfaktor für die Bildung des Barrett-Ösophagus darstellen und möglicherweise auch eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese im Ösophagus spielen.

Diese pathogenetischen Zusammenhänge wurden intensiv im Tiermodell untersucht. Die ursprünglichen Tiermodelle des Adenokarzinoms der Speiseröhre basieren auf einem chirurgisch hervorgerufenen Rückfluß von gastroduodenalen Sekreten sowie der gleichzeitigen Verabreichung von bekannten Karzinogenen, wie beispielsweise den Nitrosaminen^{19,20}. Bei alleiniger Gabe von Nitrosaminen, die spezifisch im Ösophagus wirken, werden dosisabhängig Plattenepithelkarzinome des Ösophagus induziert^{25,26}. Wird in diesem Modell weiterhin Reflux von Magen- und Duodenalsäften hervorgerufen, so steigt die Zahl der Tumore deutlich an und es entstehen darüber hinaus auch vermehrt Adenokarzinome^{19,20}. Der Beobachtungszeitraum nach den Operationen betrug in allen Studien zwischen 22 und 28 Wochen. Die besondere Bedeutung des Duodenalsaftes wird dadurch verdeutlicht, daß in Versuchen mit Reflux von reinem Magensaft und Karzinogenexposition keine Adenokarzinome entstehen²⁰. Diese Ergebnisse sind inzwischen bereits mehrfach reproduziert worden^{22,27,28}. Dabei kommt dem Reflux von Magensaft möglicherweise sogar eine protektive Bedeutung in Hinblick auf die Entstehung von Adenokarzinomen zu²².

Tierstudien, in denen keine Karzinogene verwendet wurden, zeigten auf, daß Duodenalsaft alleine die Entstehung von Adenokarzinomen sowohl im drüsigen Teil des Magens als auch im Vormagen und in der Speiseröhre^{21,23,29,30} begünstigt. So konnte zum Beispiel Fein²⁴ in fast der Hälfte (48%) aller Tiere mit duodenoösophagealem Reflux durch Ösophagojejunostomie 16 Wochen nach der Operation ein Adenokarzinom nachweisen. Bei einer Nachbeobachtungszeit von 50 Wochen wurden in einer Studie von Miwa²³ 64% Adenokarzinome, 16% adenosquamöse Karzinome und 12% Plattenepithelkarzinome diagnostiziert. In beiden Arbeiten führte man eine Gastrektomie mit Rekonstruktion mittels End-zu-Seit-Ösophagojejunostomie einer hochgezogenen Jejunalschlinge durch. Es ließ sich hiermit dokumentieren, daß im Tiermodell die Karzinogenese des ösophagealen

Adenokarzinoms durch den Reflux von Duodenalinhalte ohne zusätzliche Karzinogeninjektion möglich ist. Welche relevanten Karzinogene dabei in Frage kommen, ist bisher noch nicht untersucht worden. Trypsin als wesentlicher Bestandteil der exokrinen Pankreassekretion potenziert eine Ösophagitis^{12,13} und kann daher die Karzinogenese modifizieren. Eine promovierende Wirkung des Trypsins ist daher möglich, eine initiiierende jedoch unwahrscheinlich. Gleiches gilt für die endogenen Gallensäuren, die sicherlich als Promotor wirken^{31,32}, jedoch wohl nicht Tumor initiiierend sind.

Eine Hypothese für den Mechanismus der Karzinogenese durch Reflux von Duodenalsaft basiert auf der Bildung von karzinogenen *N*-Nitrosamiden aus physiologisch vorliegenden Gallensalzen in Rahmen einer bakteriellen Überwucherung^{33,34}. Diese könnte als Folge einer Verminderung physiologisch vorhandener, protektiver Magensäure auftreten und wäre im Tierexperiment durch das operative Vorgehen sowie in der Klinik durch eine säuresuppressive Therapie mit Protonenpumpenhemmern, H₂-Blockern oder chirurgischen Eingriffen am Magen zu erklären³⁵⁻³⁷. Eine Reihe von Bakterien ist in der Lage, zu einer Umwandlung von Gallensäuren in karzinogene *N*-Nitrosoverbindungen zu führen²⁶. *N*-Nitroso-Gallensalze wurden bereits als Karzinogene identifiziert³⁸, die bakterielle Katalyse bei der Entstehung von Nitrosobestandteilen mit karzinogener Potenz bereits als relevanter Faktor aufgezeigt²⁶. Auch die experimentell beobachtete tumorprotektive Wirkung der Magensäure wäre mittels dieser Hypothese verständlich, da es in einem sauren Milieu unumgänglich zu einer Veränderung der bakteriellen Flora kommen würde.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Voruntersuchungen und der Hypothese, daß eine bakterielle Übersiedelung zu einer endogenen Karzinogenbildung führen könnte, sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen eingehender untersucht werden:

- Können in Speiseröhre und Dünndarmsekret Bakterien nachgewiesen werden und welche sind es?
- Kann das Bakterienspektrum medikamentös oder diätetisch beeinflusst werden und welche Auswirkung hat das auf die Stoffwechselprodukte?
- Sind in der Speiseröhre der Ratte vor oder nach der Operation Gallensäuren nachzuweisen?
- Kann das Vorliegen von Nitrosoverbindungen aufgezeigt werden?

1. Einleitung

- Ist das Dünndarmsekret an sich genotoxisch oder wird es durch die operativ veränderten Bedingungen beeinflusst?
- Ergibt sich aus den Untersuchungen ein Hinweis auf die Ursachen der Karzinogenese in diesem Modell?

2. Material und Methodik

2.1 Versuchsreihen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 17 männliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Postfach 1161, 33176 Borcheln, Deutschland) im Alter von acht bzw. zwölf Wochen verwendet. Das Studienprotokoll wurde von der Tierschutzkommission der Universität Würzburg geprüft und durch die Regierung von Unterfranken im April 1998 genehmigt. Die Tiere hatten zum Zeitpunkt der Operation ein Körpergewicht zwischen 170 und 370 Gramm. Die Unterbringung erfolgte in Standardkäfigen mit je einem oder zwei Tieren, die Böden waren mit Streu bedeckt. Die Aufbewahrung erfolgte in Klimaschränken des Tierstalles der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität Würzburg. In dem geschlossenen System betrug die Temperatur $21^{\circ}\text{C} \pm 2$, die Luftfeuchtigkeit $56\% \pm 5$ und der hell-dunkel Belichtungszyklus zwölf Stunden. Die Tiere wurden nach der Ankunft registriert, vermessen und über mindestens drei Tage an die lokalen Gegebenheiten gewöhnt. Als Standardnahrung standen Pellets (Altromin 1324 der Firma Altromin GmbH, 32791 Lage), Haferflocken sowie Leitungswasser in Trinkflaschen ad libidum bereit.

Bei allen Tieren wurde eine Duodenalreflux induzierende Operation durchgeführt, deren Vorgehensweise in Kapitel 2.2 näher beschrieben wird. Dafür wurde den Tieren am Vorabend der Operation das Futter entzogen und diese am nächsten Morgen in die Tieroperationssäle der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität Würzburg gebracht. Nach dem Eingriff kamen die Tiere zurück in ihre Käfige, die nun für die folgenden acht Tage mit Zellstoff ausgekleidet waren. Damit sollte einer Anastomosenverstopfung durch orale Streuaufnahme vorgebeugt werden. Der Zugang zum Trinkwasser war sofort möglich, die Nahrungsaufnahme erst ab dem folgenden Tag.

Die erste Versuchsreihe umfaßte Untersuchungen, bei denen das Vorkommen von Nitrosogallensäuren, die Gentoxizität des Duodenalsaftes und die Bakteriendichte der Darmflora im Vordergrund standen. Sie gliederte sich in die beiden Gruppen 1a (n=3, t=2 Wochen) und 1b (n=3, t=6 Wochen), die sich anhand der Versuchsdauer, zwei bzw. sechs Wochen, unterschieden. Basierend auf den Ergebnissen dieses Versuches gestaltete sich nun das weitere Vorgehen in Versuchsreihe 2. Dabei interessierte vor allem das Bakterienwachstum und die Möglichkeit einer Modifizierung der intestinalen Keimbeseidlung. Hierfür wurden drei Gruppen (2a-c) gebildet, der Beobachtungszeitraum

2. Material und Methodik

lief jetzt über jeweils zwei Wochen. Eine zusammenfassende Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab.1: Studiendesign: (1) Bakteriell Wachstum, Nachweis von *N*-Nitroso-Gallensäuren und Gentoxizität; (2) Effekte einer oralen Antibiotikatherapie und Ansäuerung des Trinkwassers auf die Keimbesiedelung und die Menge an *N*-Nitroso-Gallensäuren

Versuch	Anzahl	Operation	Zeit	Therapie	Untersuchungen
1a	3	Reflux-OP	2	Keine	Keimbesiedelung, <i>N</i> -Nitroso-Gallensäuren Gentoxizität
1b	3	Reflux-OP	6	Keine	Keimbesiedelung, <i>N</i> -Nitroso-Gallensäuren
2a	4	Reflux-OP	2	Keine	Keimbesiedelung, <i>N</i> -Nitroso-Gallensäuren
2b	3	Reflux-OP	2	Antibiotika oral	Reduktion von Keimbesiedelung und Menge an <i>N</i> -Nitroso-Gallensäuren
2c	4	Reflux-OP	2	Säure oral	Reduktion von Keimbesiedelung und Menge an <i>N</i> -Nitroso-Gallensäuren

In Gruppe 2a (Kontrollgruppe) hatten die Tiere im Laufe des gesamten Versuchszeitraumes freien Zugang zu unbehandeltem Trinkwasser (Leitungswasser). Das zu ermittelnde Keimspektrum diente als Kontrolle für die jeweils anderen Tiere dieser Versuchsreihe. In Gruppe 2b (Antibiotikagruppe) war das Trinkwasser mit Antibiotika versetzt, wobei die oral applizierbaren Tobramycin (320 mg/l), Polymyxin B (400mg/l) und Vancomycin (500 mg/l) verwendet wurden. Diese Medikamentenkombination stellt ein bekanntes Schema für die Darmdekontamination in Tierversuchen dar und wurde bereits in vorangegangenen Studien verwendet³⁹. Diese Gruppe war als Positivkontrolle mit maximaler Reduzierung der intestinalen Keimbesiedelung geplant. Gruppe 2c (Säuregruppe) erhielt eine Flüssigkeit, in der durch Zusatz von Salzsäure (HCl) der pH-Wert bis auf 1,8 (0,016 molar) gesenkt worden war. Dadurch sollte die postoperativ nicht mehr vorhandene physiologische Magensäure alternativ ersetzt werden. Zur besseren Aufnahme durch die Tiere wurde geschmacksmodifizierend eine Beimischung von Kristallzucker (68 mg/ml) vorgenommen. Die Verabreichung begann bei allen Tieren drei Tage vor der geplanten Operation und zog sich über den gesamten Versuchszeitraum hin.

Die Gewinnung von Untersuchungsmaterial und Sekretproben wurde standardisiert und wie folgt durchgeführt: Im Rahmen der Operation aspirierte man nach Eröffnung des Intestinaltraktes aus dem Jejunum mit einer sterilen Kanüle Luminalsekret. Der für die mikrobiologische Untersuchung gedachte Teil wurde daraufhin in Eiswasser gekühlt und noch am selben Tag verarbeitet. Das übrige Sekret wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Prüfung der Gentoxizität bei -80°C asserviert. Da für Nitrosogallensäuren eine sehr kurze Halbwertszeit angegeben wird, wurden die dafür bei der Autopsie entnommenen Proben innerhalb eines Zeitraums von weniger als 2 Stunden mit der Hochleistungsflüssigchromatographie analysiert, welche an eine Tandemmassenspektroskopie gekoppelt war. Am Versuchsende erfolgte nach dem selben Vorgehen eine weitergehende äußere und innere makroskopische Überprüfung der anatomischen Gegebenheiten des Präparats. Dieses wurde dazu longitudinal eröffnet und nach Länge und Breite der makroskopisch erkennbaren entzündlichen Veränderungen vermessen. Nun halbierte man das Präparat und rollte es mit der Anastomose beginnend auf. Die Darstellung eines makroskopisch auffälligen Tumors erfolgte getrennt. Die Präparate wurden in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nachdem histologische Schnitte angefertigt waren, wurden diese mit Hämatoxylin/Eosin eingefärbt und vom Pathologen in Unkenntnis der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit begutachtet.

Um mögliche exogene Kontaminationsquellen ausschließen zu können, erfolgte eine Testung von Trinkwasser und Futtermittel auf bakterielle Bestandteile. Ebenso wurde bei allen Tieren die bakterielle Zusammensetzung des Stuhls am Vortag der Autopsie untersucht und bei der Auswertung berücksichtigt.

2.2 Durchführung der OP

Am Morgen der Operation wurde der Tier-Op vorbereitet, die nüchternen Tiere nach einer Kennzeichnung gewogen und protokolliert. Eine i.m.-Injektion von Ketanest (Ketavet®/Parke Davis; 75 mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (Rompun®/Bayer; 12mg/kg KG) leitete die Narkose ein, deren Wirkung nach etwa 2-4 Minuten eintrat und ungefähr 60 Minuten anhielt. Bei Bedarf war es intraoperativ möglich, die Medikamente intraperitoneal nachzuinjizieren und so sowohl Narkosetiefe wie auch –länge zu variieren.

Die inzwischen betäubten Tiere wurden nun am Bauch rasiert und auf einem Operationsbrett in Rückenlage in Operationsstellung gebracht. Diese sicherte man durch Fixation der Extremitäten mit entsprechenden Pflasterstreifen (Leukotape®). Das Operationsgebiet wurde daraufhin mit jodhaltiger Hautdesinfektionslösung (Betaisodona®) gewaschen und steril abgedeckt. Durchgeführt wurde eine totale Gastrektomie mit rekonstruierender End-zu-Seit-Anastomose von Speiseröhre und Dünndarm, einem Standardverfahren beim Refluxmodell der Ratte.

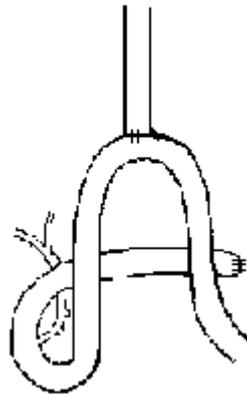


Abbildung 1: Operationsmethode: Gastrektomie und End-zu-Seit-Ösophagojejunostomie zur Induktion von Reflux von Duodenalsaft in den Ösophagus (Reflux-OP)

Der unter sterilen Bedingungen durchgeführte Eingriff begann dabei mit einer medianen Laparotomie im Oberbauch. Der Hautschnitt war etwa drei Zentimeter lang. Mit einer Pinzette wurde die Bauchmuskulatur erfaßt und auf selber Länge durchtrennt. Nachdem sowohl Wundränder als auch Leber zur Seite gehalten waren, konnte jetzt der Magen mobilisiert werden, indem mit Wattestäbchen und Schere die anatomischen Bandstrukturen gelöst und durchtrennt wurden. Danach erfolgte möglichst magennah eine Massenligatur am gastroösophagealen Übergang, der den distalen Anteil der Arteria gastrica sinistra beinhaltet. Deren proximaler Abschnitt wird hieraufhin von der Speiseröhre freipräpariert und getrennt ligiert.

Zur besseren Fixation des Ösophagus, etwa drei Millimeter vom gastroösophagealen Übergang entfernt, diente eine weiche Klemme. Sie sollte einer Gewebeschädigungen durch Kompression vorbeugen. Als nächstes wurden Speiseröhre und Arterie knapp oberhalb der gemeinsamen Ligatur durchschnitten. Mit Fäden (7-0 Prolene) wurden drei Haltenähte in

entsprechender Position gesetzt (drei Uhr, neun Uhr, zwölf Uhr). Hierbei galt es, von außen nach innen zu stechen und darauf zu achten, daß mindestens etwa ein Millimeter der ösophagealen Schleimhaut gefaßt werden konnte. Nach dem Setzen der Haltefäden wurden diese zur Seite abgelegt und die Ösophagusklemme gelöst, damit sich Zug und Druck auf die Speiseröhre weiter verringerten. Um den Magen nun vollständig entnehmen zu können, wurden als nächstes die Arteria gastrica breves, die Arteria gastroepiploica dextra et sinistra sowie Teile des Omentum majus ligiert und anschließend durchtrennt. Der proximale Anteil des Duodenum war nun freizulegen und sogleich mit einem umgebenden Faden (4-0 Vicryl) blind zu verschließen. Der Magen wurde aus der Bauchhöhle genommen, die Gastrektomie war abgeschlossen.

Zur Lokalisation des Treitz'schen Bandes, welches als Orientierungspunkt für die vorgesehene Anastomose diente, wurde -von distal nach proximal beginnend- mit Wattestäbchen der Dünndarm im relevanten Abschnitt aus der Peritonealhöhle luxiert bis dies durch die entsprechende nach dorsal verlaufende Bandstruktur des Treitz'schen Bandes verhindert wurde. Dieser Bereich wurde herausgezogen und auf der Haut, knapp unterhalb des Bauchschnittes, abgelegt. Im Abstand von ungefähr 4 cm distal zum Treitz'schen Band wurde die betreffende Jejunalschlinge auf einer Länge von etwa drei Millimetern antimesenterial mit einem Elektrokauter koaguliert. An gleicher Stelle eröffnete man mit einem Skalpell das Darmlumen. Um die für die Arbeit notwendigen präoperativen Sekretproben zu gewinnen, führte man unter Aspiration eine Kanüle in die Öffnung ein und sicherte sich so den vorhandenen Dünndarmsaft.

Nach diesem Vorgang wurden die seitlichen Haltefäden der Speiseröhre zur jejunalen Öffnung gebracht und an deren Seite von innen nach außen als Anastomose in Einzelstichtechnik verknüpft. Jetzt konnte die Vorderseite der Anastomose mit dem Zwölf-Uhr-Faden und je einem Zwischenstich zu jeder Seite fertiggestellt werden. Dabei diente der Zwölf-Uhr-Stich anfangs dazu, das Lumen der Speiseröhre offenzuhalten und somit das Erfassen der Schleimhaut für die beiden anderen Stiche zu erleichtern. Anschließend wendete man die Anastomose und führte unter Sicht auf die Vorderwand den Verschluß der Rückseite auf dieselbe Weise durch. Zum Abschluß wurde die ösophagojejunale Anastomose wieder ins Abdomen zurückgelegt und Leber und Darm in ihre anatomisch korrekte Lage gebracht. Mit einer Spritze wurde 1ml 0,9% NaCl-Lösung in die Bauchhöhle appliziert. Zur Analgesie verabreichte man Tramadol (Tramal®) subkutan. Der Wundverschluß erfolgte zweischichtig,

unter Verwendung je eines fortlaufenden Fadens (4-0 Vicryl) für Faszien- und Hautnaht. Die Tiere blieben unter Beobachtung, bis sie sich von den Auswirkungen der Narkose erholt hatten, und wurden danach in ihre Käfige zurückgesetzt. Dort hatten sie sofort wieder freien Zugang zu ihren Trinkbehältern. Die Fütterung blieb bis zum darauffolgenden Tag ausgesetzt.

2.3 Autopsie

Das Ende einer jeden Versuchsreihe stellte die Autopsie mit der anschließenden Ergebnisauswertung dar. Die Tiere wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben narkotisiert und, nachdem Brust- und Bauchhöhle eröffnet waren, mit einem Herzschnitt getötet. Daraufhin wurde das Darmpaket, bestehend aus Anastomose mit anhängendem Ösophagus und Dünndarm, entnommen und für die Histologie aufgearbeitet. Um die anatomischen Strukturen freizupräparieren, verwendete man eine Pinzette und eine feine Schere. Dabei verfolgte man die Speiseröhre bis zum kranialen Ende, den Dünndarm bis etwa fünf Zentimeter distal der Anastomose. Alle Organe, vor allem im Anastomosenbereich, wurden makroskopisch begutachtet. Dabei waren mögliche Tumore, Entzündungszeichen, Abszesse und ähnliches von Interesse. Mit einer sterilen Spritze wurde das Sekret aus Speiseröhre und Duodenum aspiriert, wobei auch die distalen im Tier verbliebenen Dünndarmstümpfe verwendet wurden. Mittels Pipette konnte nun eine definierte Menge luminalen Sekrets für die anstehenden Untersuchungen in Eppendorf-Cups titriert werden. Ein steriles Vorgehen war hierbei von besonderer Bedeutung. Um einem Zerfall oder Metabolismus der entnommenen Substanzen vorzubeugen, erfolgte eine sofortige Kühlung durch flüssigen Stickstoff oder auf gefrorenem Eis.

2.4 Histologie

Das Resektat, bestehend aus Ösophagus, Anastomose und anschließendem Jejunum wurde nach der Entnahme auf einer sterilen Unterlage abgelegt, mit einer Schere eröffnet und zur genaueren Beurteilung in vier 4 Segmente unterteilt:

- A oberer Ösophagus
- B unterer Ösophagus

C Anastomose

D Duodenum

Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen wurden festgestellt, vermessen und dokumentiert. Zur weiteren histologischen Abklärung der Speiseröhre wurde diese in Höhe der Anastomose freipräpariert, distal beginnend aufgerollt und in 10%-igen Formalin fixiert. Im Falle verdächtiger makroskopischer Befunde wurden gesonderte Probeexzisionen entnommen. Zur Weiterverarbeitung wurden die Präparate dann in Paraffin gebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin (HE) angefärbt. Die genaue histologische Auswertung erfolgte durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Justus Müller, Pathologisches Institut der Universität Würzburg.

Unter dem Mikroskop ließen sich die histologischen Veränderungen mit den makroskopischen Befunden vergleichen. Basierend auf den erarbeiteten Definitionen sollten folgende Parameter ausgewertet werden:

- Art der Entzündung des ösophagealen Plattenepithels
- Schwere der Entzündung (sowohl intra- wie auch subepithelial)
- Entstehung von Zylinderepithel im Ösophagus
- Häufigkeit maligner Tumore

2.5 Bakterien

Zur mikrobiologischen Aufarbeitung wurde während der Operation (10 µl) und bei der zwei bzw. sechs Wochen später stattfindenden Autopsie (5 µl) eine vorher festgelegte Menge an Aspirat aus dem eröffneten Darmlumen gewonnen. Die Proben waren in Eiswasser gelagert und innerhalb der nächsten zwei Stunden zur Analyse bereitgestellt, die von Herrn Dr. med. Michael Weig, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, durchgeführt wurde. Für die quantitative Bestimmung verdünnte man das Sekret 1:5 und 1:500 (Medium: Brain-Heart-Infusionen). Um qualitative Aussagen zu erhalten, beimpfte man dann in einem Drei-Ösen-Ausstrich – mit je 100µl einer jeden Lösung- 5%-igen Schafsblood-Agar (Kontrolle eines generellen Wachstums), Sabouraud-Glukose-Agar

(Selektivnährboden für Pilze), MacConkey-Agar (Wachstum von gramnegativen Stäbchen), Chocolate-Agar, KV-Blut-Agar (Anaerobier, v.a. Bacteroides) und Anaerobier-Blut-Agar. Die Nährböden wurden hieraufhin 24h bei 37°C bebrütet und danach in standardisierten Verfahren ausgewertet. Falls notwendig wurde eine genauere Differenzierung durch Selektivverfahren vorgenommen, so z.B. mit Latex/Dnase (Staphylokokken), Streptex (Streptokokken), BENT (Enterokokken), Bunte Reihe (Gramnegative Stäbchen) sowie API-E und API-NE (Fermenter – Non-Fermenter). Die Analyse der Proben von Trinkwasser, Futter und Stuhl der Tiere erfolgte semiquantitativ und ebenfalls anhand von Standardverfahren.

Die Untersuchungen zur Modifikation der bakteriellen Besiedelung im Tiermodell greifen auf das Prinzip der Darmdekontamination zurück. Diese ist zum Beispiel durch eine orale Antibiotikagabe möglich und wurde bereits unter anderer Zielsetzung untersucht³⁹. In der erwähnten Studie wurde die Antibiotikatherapie gut toleriert und eine Keimreduktion um 90% erreicht.

2.6 Nitrosogallensäuren

Entsprechend dem Vorgehen in Kapitel 2.1 sind auch für diesen Test Proben entnommen worden. Die Analyse von Gallensäuren aus dem Dünndarmsekret der Ratte wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Markus Herderich, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg etabliert und durchgeführt⁴⁰. Hierfür wurde ein Verfahren der chemischen Lebensmittel- und Naturstoffanalytik angewandt: die HPLC-MS/MS, eine an die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelte Tandem-Massenspektrographie (MS/MS). Die HPLC-MS/MS erlaubt eine effiziente Charakterisierung komplexer Proben und die Identifizierung unbekannter Minorverbindungen. Es zeichnet sich durch extrem niedrigere Nachweisgrenzen, verkürzte Probenvorbereitungszeiten sowie verringerten Zeitaufwand bei den chromatographischen Trennungen aus und ist auch bei nichtflüchtigen, polaren und labilen Analyten hilfreich. Dabei gilt es, die Moleküle in einem HPLC-Eluat zu ionisieren, effektiv in die Gasphase zu überführen und anschließend mittels massenspektrometrischer Techniken zu untersuchen. Dafür muß sowohl das Hochvakuum im Spektrometer aufrechterhalten, als auch das nichtflüchtige, polare und labile Analyt möglichst zerstörungsfrei ionisiert werden. Ferner ist es wichtig, die ionisierten Analyte selektiv und effektiv in das Spektrometer zu transferieren.

Entscheidend ist hierfür der Einsatz von Interfacetechniken wie der Elektrosprayionisierung (ESI) und der chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI). Bei beiden Interfacetechniken erfolgen die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer sowie die Ionisierung bei Atmosphärendruck. Da dabei praktisch alle Analyte intakt ionisiert werden, können als Folge der hohen Ausbeute Nachweisgrenzen im unteren pg-Bereich erzielt werden.

Im APCI-Interface wird die Probe pneumatisch im Stickstoffstrom versprüht. Die gebildeten Mikrotropfen passieren einen auf 200°C bis 400°C beheizten Glaszylinder, um das vollständige Verdampfen des Lösungsmittels zu forcieren. Die Ionisierung erfolgt ebenfalls in der Spraykammer: Durch Koronarentladung wird ein Stickstoffplasma erzeugt, das $[H_3O]^+$ -Ionen aus dem wässrigen Fließmittel generiert. Anschließend erfolgt wie bei der konventionellen chemischen Ionisation (CI) die Bildung von Analyt-Kationen durch Protonentransfer, Bildung von Adduktionen oder Ladungsaustausch. Im negativen Modus werden dagegen vor allem der Verlust von Protonen sowie die Bildung von Adduktionen beobachtet. Das APCI-Interface toleriert Flußraten von einem Millimeter pro Minute und erlaubt dadurch die Verwendung von Vier-Millimeter-Trennsäulen. Thermische Abbaureaktionen sind bei sorgfältiger Wahl der Interfacetemperatur sowie der Flußrate vernachlässigbar.

Im Gegensatz zu APCI können mittels ESI nur Analyte erfaßt werden, die bereits in Lösung ionisiert vorliegen. ESI eignet sich wie keine zweite Ionisierungstechnik zur Bestimmung makromolekularer Biomoleküle, da sich aufgrund der Bildung mehrfach geladener Molekülionen selbst Proteine und Nukleotide intakt ionisieren und mittels eines Quadrupolmassenspektrometers nachweisen lassen. Durch die Tatsache, daß ESI eine konzentrationsabhängige Nachweismethode ist, können so kleinste Probenmengen in Volumina von 1 µl und einer Flußrate von wenigen nl/min massenspektrometrisch sequenziert werden (Nanospray-Technik). Das pneumatisch unterstützte Elektrospray ermöglicht dagegen Flußraten von 200 µl/min und wird vor allem in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik verwendet, da sich Zwei-Millimeter-Trennsäulen verwenden lassen.

Sowohl ESI als auch APCI liefern je nach Meßbedingungen Molekülionen wie $[M+H]^+$, $[M+NH_3O]^+$ oder $[M-H]^-$ sowie $[M+CH_3COO]^-$. Um jedoch über die Molekularmasse eines Analyten hinaus auch noch gezielte Strukturinformationen zu erhalten, ist der Einsatz der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) erforderlich. Mittels einer Kombination von HPLC

und einem UV-Detektor mit der ESI/APCI-MS/MS kann praktisch jede Verbindung in einer komplexen Matrix - wie Naturstoffextrakte - anhand von Retentionszeit, charakteristischer UV-Absorption, Molekularmasse sowie strukturspezifischer Produktionenspektren identifiziert werden. Die zusätzliche UV-Detektion gewährleistet dabei die problemlose Vergleichbarkeit der Ergebnisse von HPLC-UV- und HPLC-MS/MS-Experimenten.

In dieser Arbeit soll als Hauptbestandteil der Gallensäuren das Darmsekret auf die Gallensäuren TCA (Taurocholicacid) bzw. GCA (Gylcocholicacid) sowie deren nitritisierte Form NO-TCA bzw. NO-GCA hin untersucht werden. Außerdem wird ein „neutral-loss-experiment“ angeschlossen. Hierbei ist von Interesse, ob es überhaupt irgendwelche NO-Gruppen beliebiger Herkunft in dem Analyt gibt. Dazu mißt man die Produkte, die aus anderen Verbindungen abgespalten werden.

Die Trennungen des Analyts wurden mit einer Pumpe des Typs Applied Biosystems 140b durchgeführt. Für die Einspritzung der Proben (5 µl) diente ein SunChrom Autosampler Triathlon (BAI, Bensheim, Deutschland). Die HPLC-MS-Analyse wurde an einem TSQ 7000 Tandemmassenspektrometersystem, ausgestattet mit einem Elektrospray-Interface (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) vorgenommen. Eine DEC 5000/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland) unterstützt von ICIS 8.1 Software (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) half bei der Datensammlung und -auswertung. Als Referenzsubstanzen wurden kommerziell erhältliche Gallensalze (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und synthetisierte *N*-Nitrosoderivate von Taurocholsäure und Glycocholsäure verwendet.

Unmittelbar vor der HPLC-Analyse wurden die Proben in wäßrigem Acetonitril (10% v/v; üblicherweise 0,1 ml) verdünnt und anschließend zentrifugiert, um klare Überstände zu erhalten. Die chromatographische Aufspaltung zur HPLC-MS-Auswertung führte man an einer Eurosher 100 C18 Säule durch (100 x 2,0 mm i.d., 5µm; Knauer, Berlin, Deutschland); Lösungsmittel A war 0,05%-iges TFA in Wasser (v/v); Lösungsmittel B Acetonitrile; die Kapillarspannung betrug 3,5kV, die Temperatur der beheizten Innenkapillare 240°C; Nitrogen diente als Mantel- und Hilfgas.

2.7 Gentoxizität

Zur Beurteilung gentoxischer Aktivitäten im Duodenalsekret wurden je Proben vor und nach der Operation entnommen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Auswertung erfolgte anhand des sogenannten Mikronukleolus-Testes (MNT). Dieser Test, der auf verschiedene Arten gentoxischer Veränderungen reagiert, ist ein fester Bestandteil der Analyse von Gentoxizität bei Säugern und wurde von Frau Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper, Institut für Toxikologie der Universität Würzburg, durchgeführt⁴¹. Duodenalsaft wurde hierfür in verschiedenen Konzentrationen zu 1,5 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von L5178Y Mauslymphomzellen hinzugefügt. Etoposide (5ng/ml) oder Ethyl-Methan-Sulfonate (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dienten als Positivkontrolle. Die Chemikalie wurde nach vier Stunden durch Mediumersatz herausgewaschen, das Probensekret verblieb in der Kultur. In der Expressionszeit wurde Cytochalasin B (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beigelegt. Diese Substanz hindert die Zellen an einer postmitotischen Cytokinese, was eine binukleäre Zelle zur Folge hätte. Die Analyse der Häufigkeit eines Mikronukleolus kann somit auf den Anteil von aktiv proliferierenden Zellen beschränkt werden. Darüber hinaus dient der Prozentsatz an binukleären Zellen als Indikator für zytotoxische Einflüsse (Einschränkung der Zellproliferation).

Nach 20 Stunden Expressionszeit wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert, auf mikroskopische Glaträger aufgebracht und mit Methanol fixiert (-20°C , 1h). Um die Zellkerne und Mikronukleoli anzufärben, wurden die Träger mit 0,00625% acridine orange (gelöst in Sörensen-Puffer) inkubiert, zweimal mit Sörensen-Puffer gewaschen und in Puffer für die Mikroskopie fixiert. Bei einer 500-fachen Vergrößerung wurden die Zellen auf die Anzahl von Zellkernen und Mikronukleoli hin untersucht. Es folgte die Bestimmung der Prozentsätze an Zellen, die einen, zwei oder mehr Zellkerne enthielten, und derer, die zwei Kerne (binukleär) sowie Mikronukleoli aufwiesen. Strukturen wurden als Mikronukleoli eingestuft, wenn sie getrennt vom Zellkern bzw. den Zellkernen erschienen, rund oder oval waren, nicht mehr als ein Viertel der Zellkerngröße aufwiesen und sich ähnlich anfärben ließen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte zweier Präparate eines jeden Versuchs aufgeführt, von denen mindestens 1000 Zellen nach Zellkernen untersucht und pro Träger 1000 binukleäre Zellen auf die Gegenwart von Mikronukleoli hin analysiert wurden. Dabei interessierte vor allem, ob der Duodenalsaft an sich gentoxisch wirkte oder derartige Komponenten beinhaltete.

2.8 Statistik

Bei den vorliegenden Versuchsreihen wurde eine Gesamtzahl von 17 Tieren verwendet. Die Dauer der jeweiligen Experimente belief sich auf zwei bis sechs Wochen. Die Behandlung in der zweiten Versuchsreihe wurde randomisiert durchgeführt. Dabei begründen sich sowohl die kurze Laufzeit, als auch die geringe Tierzahl mit den sehr aufwendigen, gleichzeitig aber hochsensitiven Messmethoden. Gentoxizitätsuntersuchungen und HPLC-MS/MS-Analysen erfolgten jeweils mit methodenspezifisch notwendiger Wiederholungszahl. Die Angabe der gewonnenen Daten erfolgt als Mittelwert der entsprechenden Versuchsgruppen, unter Berücksichtigung der betreffenden Standardabweichung. Aufgrund der kleinen Fallzahl wurde kein statistischer Gruppenvergleich angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemein

Im Verlauf der Experimente wurden sowohl Narkose, als auch Operation und Medikamentengabe von den Tieren gut toleriert. Zwei Tiere verstarben am ersten postoperativen Tag. Als Ursache ihres Todes konnte bei der Autopsie eine Anastomosenverstopfung durch Zellstoff ermittelt werden, die wahrscheinlich durch anschließende Aspiration zum Tode führte. Es muß angenommen werden, daß die Zellstoffaufnahme während der postoperativen Nüchternheitsphase erfolgte, da in diesem Zeitraum eine solche Käfigauskleidung vorlag. Bei einem weiteren Tier wurde eine deutliche Gewichtsabnahme festgestellt. Auch hier stellte man eine Anastomosenverstopfung mit Spreu fest. Es gilt deswegen zu überlegen, ob in zukünftigen Versuchen eine Gitterauskleidung des Käfigbodens erfolgen sollte, um einer möglichen Anastomosenverstopfung in den spezifischen Phasen vorzubeugen.

Der Gewichtsverlauf in Tabelle 2 zeigt, daß trotz des erfolgten Eingriffs keine sehr starke Beeinträchtigung der Tiere erfolgte. Die leichte Gewichtsabnahme ist mit den postoperativen Veränderungen vereinbar und war am Versuchsende weitgehend stabil. Daß es nicht wie in vorangegangenen Studien zu einer Gewichtszunahme kam, ist mit der kurzen Laufzeit der Arbeit (t= 2 Wochen) zu erklären.

Tab.2: Gewichtsveränderungen unter Berücksichtigung der verschiedenen Versuchsreihen

Versuch	Dauer	Ausgangsgewicht	Endgewicht in %
Gastrektomie	2 Wo	201,6 g	85,86
- „ -	6 Wo	182,6 g	93,5
- „ -	2 Wo	367 g	77,5
- „ - + Antibiotika	2 Wo	365 g	82,33
- „ - + Säure	2 Wo	322,6 g	83,3

Weiterhin gilt es zu erwähnen, daß bei allen Tieren der Antibiotikagruppe sowohl intraoperativ wie auch am Tage der Autopsie ein erheblich geblähtes Ileum gefunden wurde, bei denen auch das Zäkum zum Teil weit dilatiert vorzufinden war. Diese Veränderungen dürften wohl auf die erfolgte Medikation zurückzuführen sein und sollten bei der Planung weiterer Experimente berücksichtigt werden.

Bei allen Tieren wurde im Rahmen der Autopsie eine meist schwere Entzündung der Schleimhaut im Umfeld der Anastomose, sowie mäßige bis tiefe Ulzerationen festgestellt. In drei Fällen hatte sich am Duodenalstumpf ein Abszeß gebildet. Bereits makroskopisch auffällig war bei einem Tier nach 6 Wochen ein kleiner, anastomosennaher Tumor, der sich histologisch als Adenokarzinom sichern ließ. Dadurch konnte die Bedeutung dieses Tiermodells im Rahmen der refluxbedingten Entstehung von Adenokarzinomen in der Speiseröhre unterstrichen werden.

3.2 Histologie

In der Histologie konnte in den Präparaten aller Tiere eine meist schwere Ösophagitis nachgewiesen werden. Dabei erwies sich das Plattenepithel entweder als hyperplastisch (Verdickung mit normalem Reifegrad und Hyperkeratose) oder regenerativ (Höhenzunahme der Lamina propria papillae, Basalzellhyperplasie, keine Hyperkeratose). Letztere Veränderungen waren identisch zu den für Refluxösophagitis beschriebenen Folgen beim Menschen. Bei keinem Tier fand sich ein Zylinderepithel in der Speiseröhre. Bei einem Versuchstier lies sich bereits nach einer Refluxexposition von 6 Wochen in Höhe der Anastomose ein kleiner Tumor (Durchmesser 1 mm) nachweisen, der histologisch als Adenokarzinom gesichert werden konnte und somit denen vorangegangener Studien^{23,24,30} entsprach.



Abbildung 2: Makroskopisches Autopsiepräparat der ösophagojejunalen Anastomose mit Dilatation des distalen Ösophagus und ausgeprägter Ösophagitis (Papillomatose des Plattenepithels).

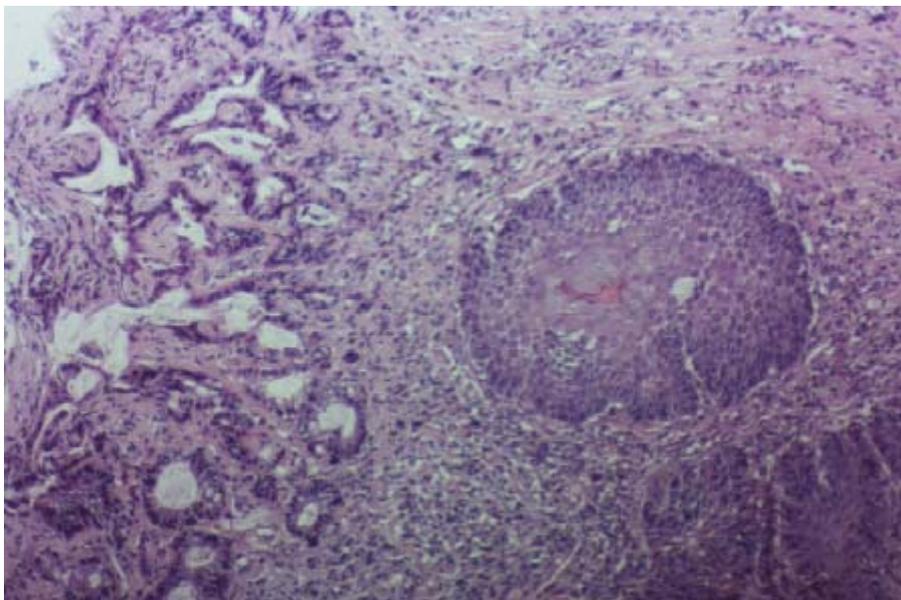


Abbildung 3: Histologischer Schnitt einer postoperativen ösophagojejunalen Anastomose, unauffälliger Befund (HE-Färbung)

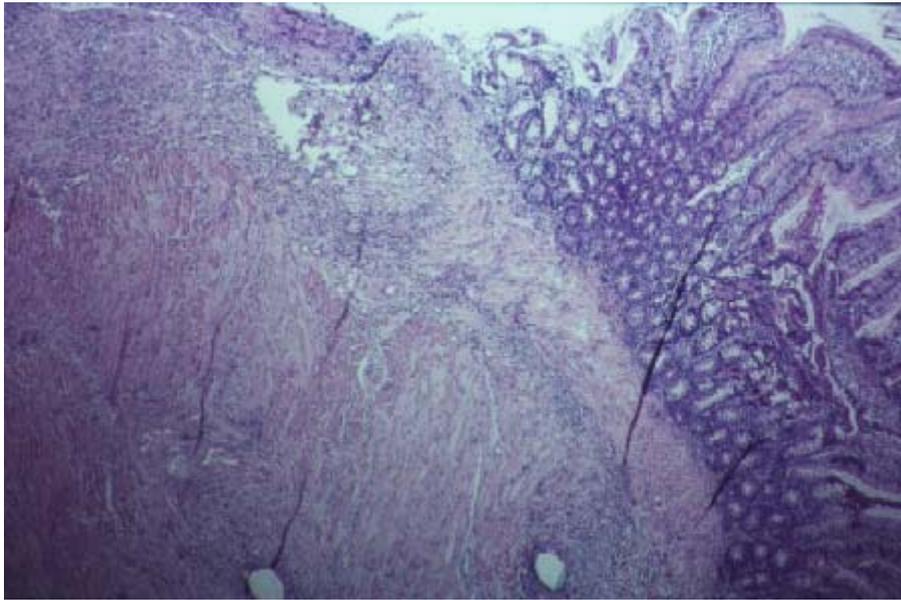


Abbildung 4: Histologischer Schnitt einer Ösophagitis mit Ulkus im Anastomosenbereich (HE-Färbung)

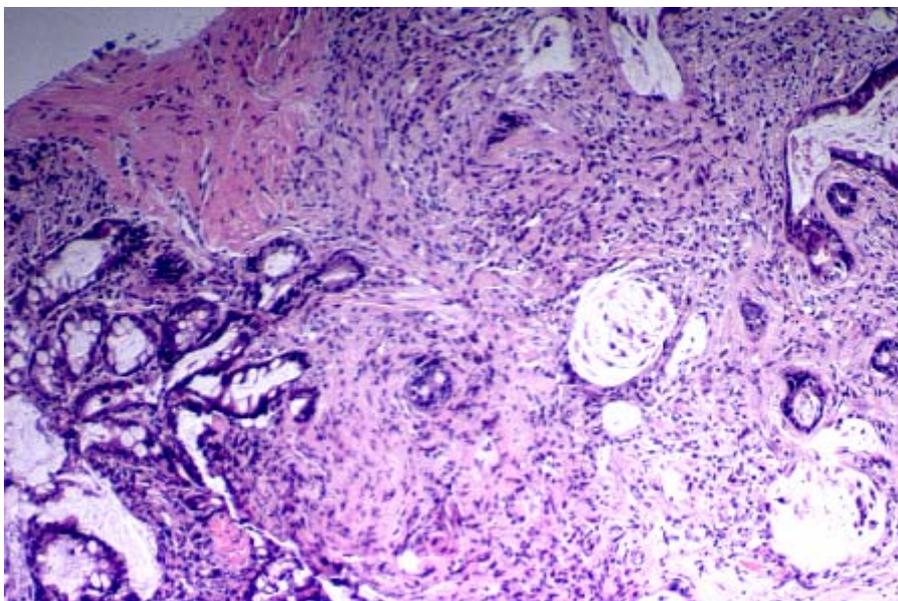


Abbildung 5: Histologischer Schnitt eines Adenokarzinoms der Speiseröhre (HE-Färbung)

Gravierende Unterschiede in der Histologie der einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich nicht. Es sollte jedoch erwähnt werden, daß im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Säure-Tieren tendenziell weniger Ulzerationen der Schleimhaut zu finden waren. Bei

3. Ergebnisse

Antibiotikagabe fanden sich keine Abszesse im Anastomosenbereich. Die Befunde sind in Tabelle 3 dargestellt.

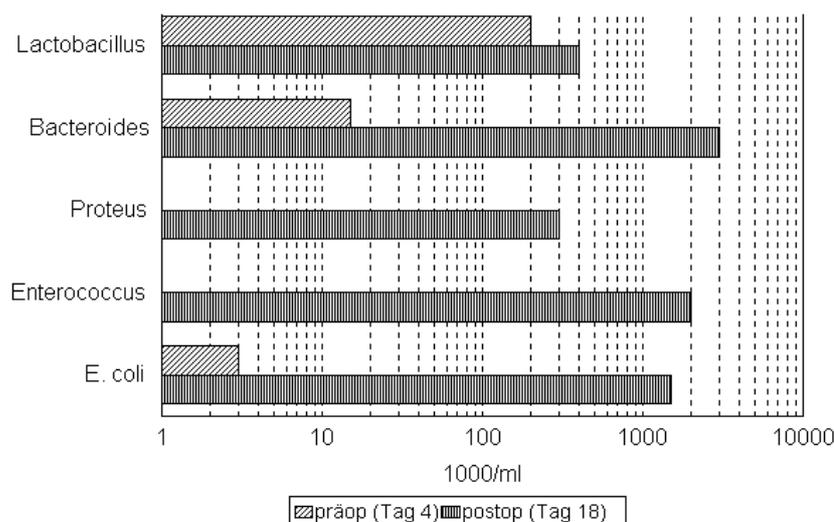
Tab.3: Darstellung der anatomischen und histologischen Befunde der medikamentenmodifizierten Versuchsreihe zum Zeitpunkt der Autopsie

Versuch	Abszeß	Ösophagitis	Ulkus
2a (OP)	+++	++	+++
2b (OP + AB)	+	+	++
2c (OP + SR)	+	+	+

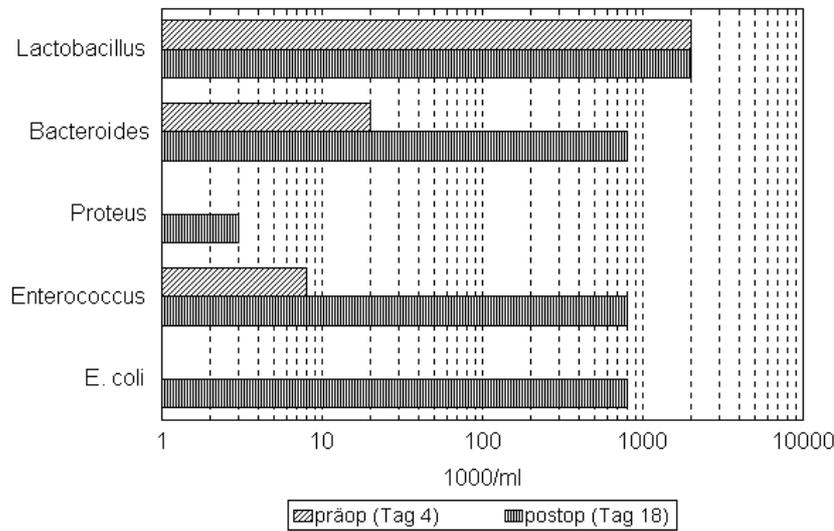
3.3 Bakterien

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der intestinalen Keimbesiedelung vor und nach dem chirurgischen Eingriff sind in den Graphiken a bis c dargestellt. Alle Daten sind als Medianwerte dargestellt.

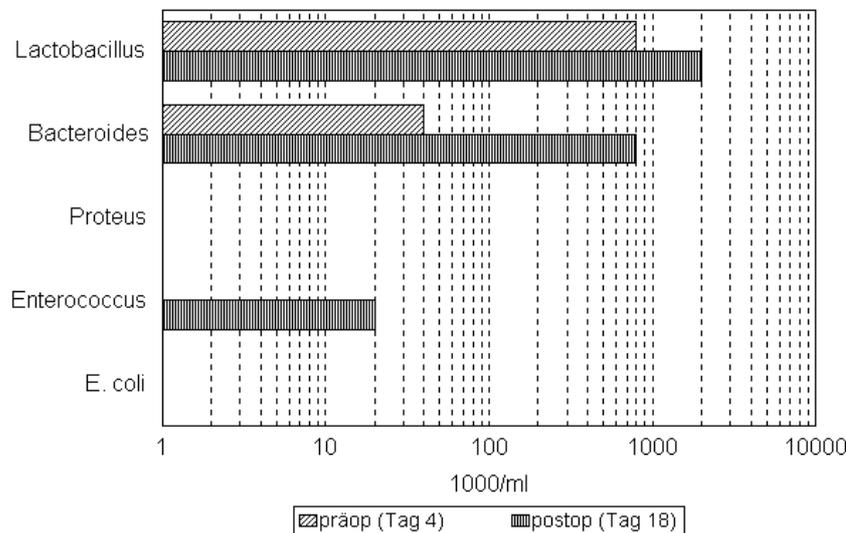
Graphik a: Intestinale Bakterienkonzentration (Kontrollgruppe)



Graphik b: Intestinale Bakterienkonzentration (Säuregruppe)



Graphik c: Intestinale Bakterienkonzentration (Antibiotikagruppe)



In den Tieren der Kontrollgruppe (Graphik a), wurden in der Bakterienflora des Jejunums *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* nachgewiesen. *E. coli* wurde in geringen Konzentrationen gefunden. Zwei Wochen nach der Gastrektomie mit folgender Ösophagojejunostomie konnte eine bakterielle Überwucherung des Jejunums mit Fäkalkeimen beobachtet werden. *E. coli*, *Proteus spp.* und *Enterococcus spp.* erreichten

3. Ergebnisse

Konzentrationen bis zu einer Millionen pro ml. *Bacteroides spp.* zeigte sich im Vergleich zur präoperativen Probe viel stärker, während sich *Lactobacillus spp.* nicht wesentlich veränderte.

Auch in den Tieren, die angesäuertes Trinkwasser erhielten (Graphik b), konnte im Jejunum ein Überwuchs von Fäkalkeimen gesehen werden. Das Bakterienspektrum vor und nach der Operation stimmte weitgehend mit dem der Trinkwassergruppe überein. Im Gegensatz dazu beobachtete man in den Proben, die postoperativ von den antibiotikabehandelten Tieren gewonnen wurden (Graphik c), eine Eliminierung von *E. coli* und *Proteus spp.*, während die Konzentration von *Enterococcus spp.* deutlich reduziert war. *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* erwiesen sich gegenüber dem verabreichten Antibiotikaregime als resistent und wurden sowohl vor als auch nach dem Eingriff in Größenordnungen gefunden, die dem der anderen zwei Gruppen ähnlich waren.

Die Analyse von Trinkwasser und Futter zeigte keine bakterielle Verunreinigung. In Tabelle 4 sind diejenigen Keime aufgeführt, die im Stuhl der Tiere nachgewiesen werden konnten.

Tab.4: Bakterieller Inhalt des Tierstuhles zwei Wochen nach der Operation und 17 Tage nach Beginn der Behandlung. Das Antibiotikaregime eliminierte *E. coli*, beeinflusste die übrige Fäkalflora aber nicht deutlich.

Gruppe	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Proteus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i>
Leitungswasser	+++	+++	+	++	+++
Antibiotika	+++	+++	++	+	-
Sauerer Wasser	+++	+++	+	+++	+++

Dieses Spektrum ist identisch zu dem des Jejunums nach der Operation. Demnach ist es anzunehmen, daß es sich bei den im Dünndarm gefundenen Erregern um aufgenommene Stuhlkeime handelt. Es gab keine wesentlichen Unterschiede der Bakterienflora in den Stühlen innerhalb der drei Gruppen, mit der Ausnahme einer völligen Auslöschung von *E. coli* in den Tieren, denen Antibiotika verabreicht wurden.

3.4 Nitrosogallensäuren

Im Rahmen der HPLC-MS/MS-Analyse konnte das Vorhandensein von Gallensäurederivaten als charakteristisches Muster in allen präoperativen Proben gezeigt werden (Abbildung 2). Auch in den postoperativen Proben ließ sich dies nachweisen (Abbildung 3, oberes Chromatogramm). Dabei dominierten TCA und GCA als vorherrschende Konjugate.

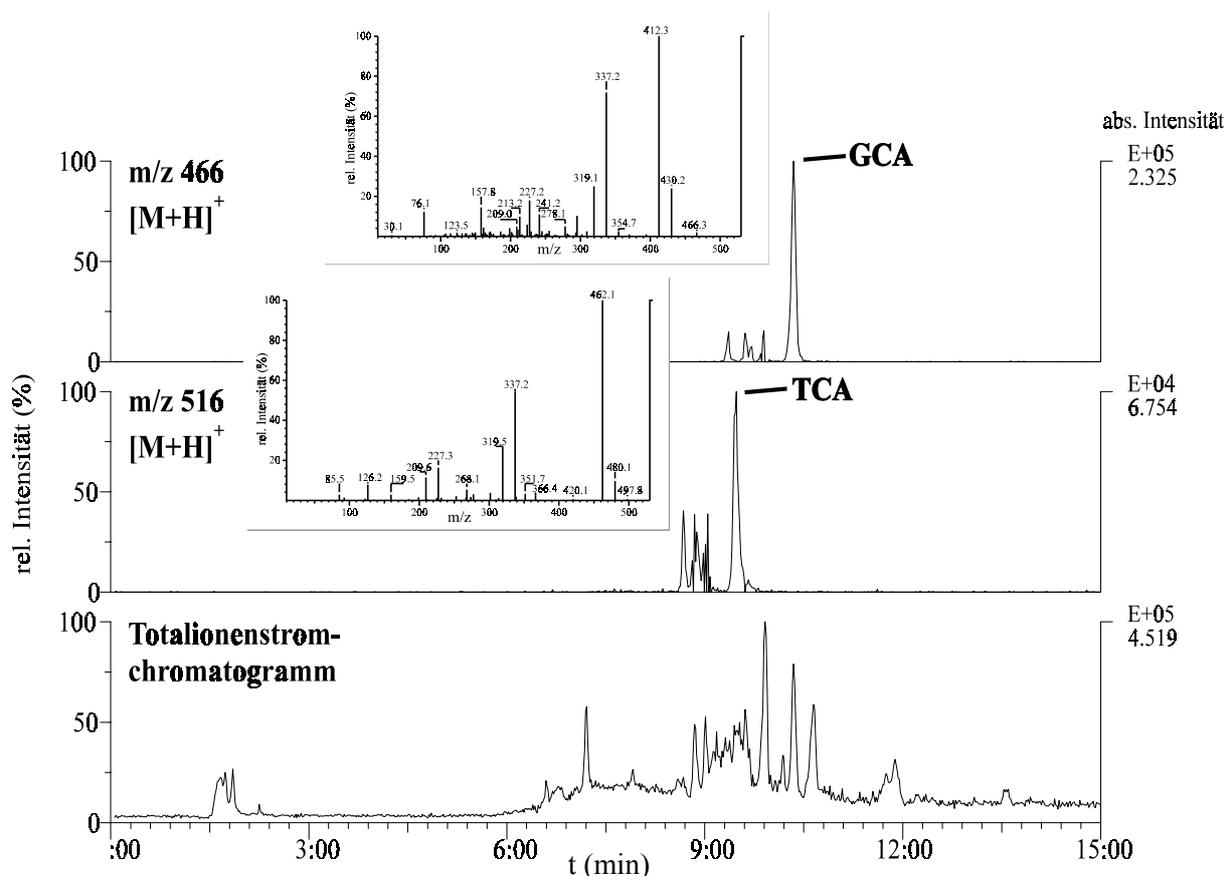


Abbildung 2: HPLC-ESI-MS/MS Analyse von Duodenalsaft: Die Zeitachse zeigt die Trennung auf einer RP18-Säule mit Gradientenelution und Acetonitril (0.05%TFA in Wasser) als Fließmittel. Auf der unteren Spur werden alle nachgewiesenen Ionen dargestellt; die mittlere und obere Spur wurde unter Verwendung der entsprechenden Massen der Gallensäuren GCA (Gylcocholicacid) und TCA (Taurocholicacid) berechnet. Um die Identität der beiden Hauptpeaks als TCA bzw. GCA abzusichern, wurden Produktionenexperimente durchgeführt. Die erhaltenen Produktionenspektren sind in den beiden Einschüben abgebildet, die einzelnen Produktionen lassen sich strukturellen Elementen von TCA bzw. GCA zuordnen. Die NO-Derivate sollten 29 amu "schwerer" sein und entsprechende Massenspektren liefern, sind jedoch hier nicht zu finden. (Auswertung von Priv.-Doz. Dr. M. Herderich)

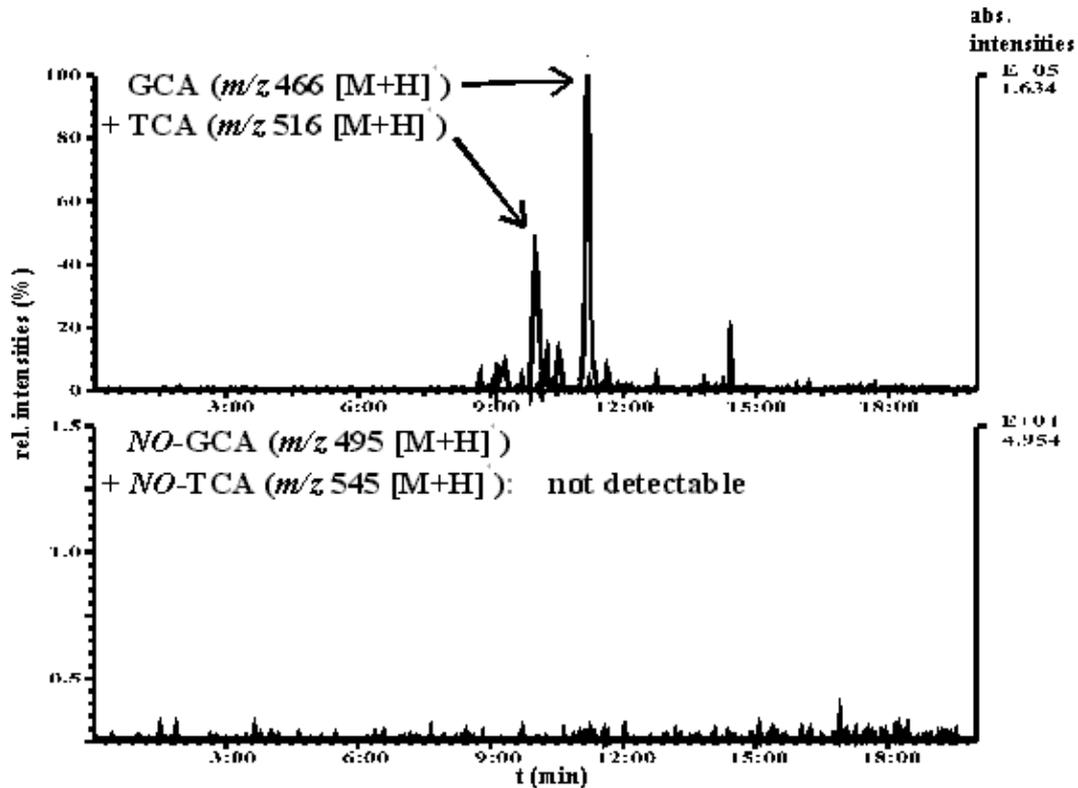


Abbildung 3: HPLC-ESI-MS/MS Analyse von Duodenalsaft (postoperativ): Analyse von GCA und TCA (oben), sowie NO-GCA und NO-TCA (unten)

Die Identifizierung von TCA (Taurocholicacid) und GCA (Gylcocholicacid) wurde dadurch gesichert, daß die bei den Tierproben ermittelten Werte mit den käuflich erworbenen Referenzsubstanzen verglichen wurden. Um die genaue Identifizierung der gesuchten Substanzen sicherzustellen, wurden Masse, Fließgeschwindigkeit und charakteristisches Zerfallsspektrum untersucht.

Alle Analysen zeigten, daß in den Tierproben weder NO-TCA, noch NO-GCA gefunden werden konnten (Abbildung 3, unten). Die relative Empfindlichkeitsgrenze für *N*-Nitroso-Substanzen lag bei 0,1% der gemessenen Referenzintensität von TCA und GCA. Im Vergleich dazu konnten die kommerziellen Referenzsubstanzen, einschließlich der NO-Verbindungen nachgewiesen werden, was auch durch eine Lagerung bei -20°C über einen Zeitraum von mehr als 4 Wochen nicht beeinflusst wurde. Damit konnte die Stabilität der Verbindung bei genannter Temperatur unterstrichen und Artefakte der Proben durch

Lagerung ausgeschlossen werden. Eine ESI-Massen-Spektrometrie hatte jedoch den labilen Charakter von *N*-Nitroso-Gallensäuren bei Tests an Referenzsubstanzen aufgezeigt.

Auch das durchgeführte „neutral-loss-experiment“ brachte ein negatives Ergebnis. Eine anfangs als Nitroso-Gruppe verdächtige Substanz einer präoperativen Probe stellte sich bei der weiteren Analyse der Zerfallsprodukte als das für die Narkose verwendete, massengleiche Ketamin (Ketanest®) heraus. Es soll betont werden, daß der Nachweis dieser Substanz praktisch bereits wenige Minuten nach der intramuskulären Verabreichung erfolgte, was die Sensitivität des verwendeten Verfahrens weiter unterstreicht. Das Fehlen von NO-TCA und NO-GCA in den Tierproben wurde durch weitere hochspezifische Verlaufsexperimente bestätigt. Zusammen mit dem negativen Ergebnis des „neutral-loss-experiments“ und dem deutlichen Nachweis von Standardgallensäuren und Referenzsubstanzen dürfte dadurch die Bildung nachweisbarer Mengen von *N*-Nitroso-Gallensäuren in diesem Tumormodell des Ösophagus auszuschließen sein.

3.5 Gentoxizität

Sowohl für den Mikronukleolus-Test (MNT) als auch die Nitrosogallensäure-Analyse standen Proben in der Größenordnung von 2 µl bis 10 µl zur Verfügung. Der pH-Wert wurde bei pH 6,6 bis 7,3 gemessen. Die Auswertung des Mikronukleolus-Test ergab beim Duodenalsekret eine erhöhte Toxizität, die anhand des Anteils an binukleären Zellen gemessen wurde. Der Anteil an binukleären Zellen kann als Maßstab für zytotoxische Auswirkungen (Hemmung der Zellproliferation) dienen. Dennoch ließ sich bei keiner der verschiedenen Konzentrationen eine vermehrte Mikronukleolus-Bildung feststellen. Im Gegensatz dazu fand sich bei den Positivkontrollen, für die EMS (Ethyl-Methan-Sulfonate) und Etoposide verwendet wurden, regelmäßig eine deutliche Erhöhung der Mikronukleoli-Zahl. Im folgenden werden die Ergebnisse zweier repräsentativer Versuche gezeigt. Diese ergeben durchwegs keinen Hinweis auf Gentoxizität.

Ein vorausgehendes Experiment ohne den Gebrauch von Cytochalasin B brachte ebenfalls ein negatives Ergebnis. Deswegen kann gefolgert werden, daß Duodenalsaft, der sowohl prä- als auch postoperativ gewonnen wurde, in der *in vitro* Mikronukleolus-Analyse unter diesen Bedingungen nicht gentoxisch ist.

Tab.5: Mikronukleolus-Test in L5178Y Lymphoma-Zellen der Maus (Versuch 1)

BNC = binucleate cells (binukleäre Zellen). Mn-Cells = micronucleus containing cells (Zellen mit Mikronukleolus).

	% BNC	Mn-Cells/1000 BNC
Kontrolle	79	4.5
EMS 400µg/ml	42	21.8
Prä-OP 2 µl/ml	73	3.7
Prä-OP 4 µl/ml	32	4.6
Post-OP 2 µl/ml	83	7.5
Post-OP 4 µl/ml	68	2.5
Post-OP 6 µl/ml	37	3.9

Tab.6: Mikronukleolus-Test in L5178Y Lymphoma-Zellen der Maus (Versuch 2)

BNC = binucleate cells (binukleäre Zellen). Mn-Cells = micronucleus containing cells (Zellen mit Mikronukleolus).

	% BNC	Mn-Cells/1000 BNC
Kontrolle	73	8.0
Etoposide 5 ng/ml	51	70.0
Prä-OP 2 µl/ml	36	7.7
Prä-OP 4 µl/ml	13	7.5
Post-OP 2 µl/ml	57	8.0
Post-OP 4 µl/ml	35	5.7

3.6 Beantwortung der Fragen

- Anhand mikrobiologischer Tests konnte die intestinale Keimbesiedelung nach Art und vorliegender Konzentration der Bakterien analysiert werden. So war es möglich, bei allen unoperierten Tieren ein Wachstum von *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* deutlich nachzuweisen. Dazu konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich die selben Bakterien auch postoperativ finden ließen. Ferner war jetzt jedoch vor allem das zusätzliche Auftreten von Fäkalkeimen wie *E. coli*, *Enterococcus spp.* und *Proteus spp.* auffällig. Aufgrund der Tatsache, daß diese präoperativ noch nicht vorhanden waren, muß von einem veränderten Keimspektrum operierter Tiere ausgegangen werden. Die gefundenen Bakterien sind potentiell in der Lage, Nitrosierungsreaktionen durchzuführen.
- Die Applikation von säureversetztem Trinkwasser führte zu einem Bakterienspektrum, das der Kontrollgruppe ähnlich war. Lediglich die Konzentrationen waren etwas erniedrigt. Die Gabe von Antibiotika eliminierte hingegen sowohl *E. coli* wie auch *Proteus spp.*. Die Werte für *Enterococcus spp.* waren reduziert, *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* unverändert nachweisbar. Der geringe Effekt der exogenen Modifikation erklärt weiterhin, daß es zu keinen Auswirkungen auf die Stoffwechselprodukte der veränderten Flora kam. Alle Tests auf Nitrosoverbindungen bzw. Gentoxizität erbrachten negative Ergebnisse.
- Das Vorhandensein von Gallensäuren im Bereich der ösophagojejunalen Anastomose konnte im Rahmen dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden. Alle HPLC-MS/MS-Analysen fielen dabei prä- wie postoperativ positiv aus. Dabei dominierten TCA (Taurocholicacid) und GCA (Glycocholicacid) als vorherrschende Konjugate. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden diese mit käuflichen Referenzsubstanzen verglichen und klar bestätigt.
- Ein Vorliegen von Nitrosoverbindungen kann anhand der durchgeführten Tests ausgeschlossen werden. Diese wurden mit dem höchst sensitiven Verfahren der HPLC-MS/MS analysiert und fielen alle eindeutig negativ aus. Dem gegenüber steht der positive Nachweis der kommerziellen Proben. Eine anfangs verdächtige Substanz wurde als das nur wenige Minuten vor der Operation applizierte, massengleiche Ketanest® ermittelt und unterstreicht somit die Sensitivität des Untersuchungsverfahrens.

3. Ergebnisse

- Dieser Ausschluß wird durch die fehlende Genotoxizität des Dünndarmsekrets unterstrichen. Zwar zeigte sich für die Proben in den Mikronukleolus-Tests (MNT) eine erhöhte Toxizität (Anstieg der binukleären Zellen), eine direkte Schädigung der DNA ist aber prä- wie postoperativ auszuschließen (kein Nachweis von Mikronukleoli). Somit wird die fehlende direkt tumorinitiierende Wirkung des Dünndarmsekrets unterstrichen.
- Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird die anfangs angenommene Hypothese der endogenen Bildung von *N*-Nitroso-Gallensäuren verworfen. Vielmehr lassen nun die stets gefundenen Entzündungsparameter und die notwendige Dauer der Reizexposition bis zur Tumorentstehung den Prozess der chronischen Entzündung als wahrscheinlichste Ursache erscheinen.

4. Diskussion

Die Häufigkeit des Adenokarzinoms der Speiseröhre ist in den letzten Jahren stark angestiegen, der genaue Mechanismus, der der Karzinogenese zugrunde liegt, ist aber immer noch unbekannt. Im Rahmen verschiedener Studien wurden eine Vielzahl möglicher Faktoren untersucht, wie zum Beispiel die Rolle der Lebensgewohnheiten (Diät, Tabakrauch, Bluthochdruck)^{28,42,43}, Medikamenteneinnahme^{44,45}, die Bedeutung des Pankreassaftes^{19,27}, eine Beteiligung alkalischer Dünndarmkomponenten⁴⁶, Bildung von DNA-Addukten sowie eine Infektion mit *Helicobacter pylori*⁴⁷. Richtungsweisende Ergebnisse stehen aber immer noch aus. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Antwort hinter dem karzinogenen Potential von *N*-Nitroso-Bestandteilen vermutet³⁴. Neben der Aufnahme von Nitraten aus dem Bereich Diät und Umwelt, muß die endogene Entstehung von *N*-Nitroso-Derivaten bedacht werden. Eine Hypothese zur Tumorentstehung basierte auf der Annahme, daß physiologisch vorhandene Gallensäuren im Rahmen einer bakteriellen Besiedelung endogen in karzinogene *N*-Nitroso-Verbindungen umgewandelt werden könnten⁴⁸. Voraussetzung für den Beleg dieser chemischen Reaktion wäre der Nachweis einer bakteriellen Überwucherung, insbesondere mit Keimen, die Nitrat in Nitrit umwandeln könnten, sowie eine positive Testung von Nitrosoverbindungen im Duodenalsekret. Unter physiologischen Bedingungen würde der saure pH-Wert des Magens diesen Keimwuchs stark einschränken oder gar ganz verhindern und somit einer Bildung relevanter Karzinogene entgegenwirken.

Die Auswertung der intestinalen Mikroflora ergab ein regelmäßiges Wachstum von *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* im Jejunum unoperierter Tiere. In Folge des Eingriffs kam es in allen Experimenten zu einer Übersiedelung mit Fäkalkeimen, obwohl eine exogene Zuführung durch die negative Testung von Trinkwasser und Futtermittel ausgeschlossen sein dürfte. Die Bakterien, die postoperativ im Jejunum identifiziert wurden, sind in der Lage, endogene Reaktionen zu katalysieren, welche potentielle Karzinogene und Kokarzinogene hervorbringen³³. So kann zum Beispiel die Hydroxilierung von primären zu sekundären Gallensalzen durch *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* erfolgen. Weiterhin enthalten *Enterococcus spp.* und *Bacteroides spp.* Enzyme, die Nitrat zu Nitrit reduzieren⁴⁹. Bakterielle Cytochrom cd₁-Nitrit-Reduktase, welche eine Nitrosation beschleunigt, wurde in *E. coli* und *Proteus spp.* gefunden⁵⁰. Diese Enzyme könnten die Bildung von Nitrosoverbindungen aus Gallensalzen katalysieren⁵¹ und somit bekannte Karzinogene hervorbringen³⁸.

Die Modifizierung der intestinalen Mikroflora stellt einen möglichen Ansatz dar, um die Rolle des bakteriellen Stoffwechsels in diesem Modell eingehender zu untersuchen. Zu diesem Zweck war das Trinkwasser zum einem angesäuert²⁴, zum anderen mit Antibiotika versetzt worden³⁹. In der Säuregruppe konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine wesentlichen Veränderungen der intestinalen Flora beobachtet werden. Es konnten sowohl *Lactobacillus spp.* als auch ein Anstieg von *Bacteroides spp.* nachgewiesen werden, zudem nahmen auch *Enterococcus spp.* und *E. coli* deutlich, *Proteus spp.* etwas schwächer zu. In der Antibiotikagruppe wurde die Besiedelung des Jejunums mit Fäkalkeimen stark reduziert, *E. coli* und *Proteus spp.* beseitigt und die Konzentration von *Enterococcus spp.* ging stark zurück. Dem hingegen wurden *Lactobacillus spp.* und *Bacteroides spp.* durch die Antibiotikagabe weder ausgelöscht noch reduziert. Wie zu Beginn beschrieben, sind die verweilenden Bakterien in der Lage, den Duodenalsaft zu verändern. Dies und die Tatsache, daß eine im Vergleich zur Duodenalanalyse unterschiedliche Keimbesiedelung des Stuhls auf eine frühzeitige Antibiotikainaktivierung bzw. -resorption hinweisen könnte, zeigt, daß das angegebene Antibiotikaregime nicht für zukünftige Untersuchungen zur Bedeutung der bakteriellen Besiedelung bei der Pathogenese des Ösophaguskarzinoms empfohlen werden kann. Möglicherweise empfiehlt sich die zusätzliche Gabe anderer Substanzen wie zum Beispiel Metronidazol. Eine verlässliche Untersuchung dieser Thematik würde aber nur die Verwendung keimfreier Tiere erlauben oder eine Analyse des Duodenalsaftes auf bakterielle Endprodukte, welche möglicherweise relevant für die Karzinogenese sind.

Zur weiteren Überprüfung der anfangs genannten Hypothese sollten die Proben nun auf die Anwesenheit von Nitroverbindungen hin getestet werden. Es zeigte sich jedoch in allen Experimenten dieser Studie, daß im Tiermodell trotz zuverlässiger HPLC-MS-Analysen keine *N*-Nitroso-Gallensäurekonjugate nachzuweisen waren, während in allen Proben TCA und GCA als primäre Bestandteile des Duodenalsaftes demonstriert werden konnten. Bedenkt man das nur mäßige mutagene und karzinogene Potential von NO-TCA und NO-GCA und die deshalb für eine Reaktion notwendige Menge, so scheint es nach diesen Ergebnissen doch sehr unwahrscheinlich, daß die endogene Nitrosierung von Gallensäuren wesentlich zur Reflux bedingten Karzinogenese beiträgt. Da es sich bei der chemischen Nitrosierung um eine unspezifische Reaktion handelt, können NO-TCA und NO-GCA durchaus als Markersubstanzen einer generellen Nitrosierung verwendet werden und ein Vorhandensein anderer *N*-Nitroso-Bestandteile ausschließen. Weiterhin stellt das Verfahren der HPLC-MS eine äußerst sensitive Methode dar, was sich bei der Analyse der Kontrollsubstanzen und dem

Auffinden der strukturverwandten Ketamingruppe bestätigte. Die Nitrosobestandteile von TCA und GCA zeigten sich in *in-vitro* Tests als gentoxisch⁵². Vor diesem Hintergrund bestärken die negativen Gentoxizitätstests den Verdacht, daß in den Proben des Duodenalsaftes keine relevanten Mengen an Nitrosobestandteilen vorhanden sein können. Zudem zeigte keine der weiteren im Intestinalsekret vorhandenen Substanzen Zeichen von Gentoxizität. Dies stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein, in denen Gallensalzen eine mögliche promovierende, nicht aber direkt karzinogene Wirkung zugesprochen wurde³².

Nachdem nun gezeigt werden konnte, daß keine karzinogenen Nitrosobestandteile im Duodenalsekret anwesend waren und es keine Gentoxizität in den *in-vivo* Tests gab, bleibt die Frage nach dem Mechanismus der Karzinogenese unbeantwortet. Auffällig in allen Untersuchungen war, daß die Tumorentstehung eng mit einer im Vorfeld abgelaufenen Entzündungsreaktion verbunden schien. Blieb diese aus, konnten auch keine Neoplasien nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Verweildauer des Refluxats und der Anzahl der nachgewiesenen Karzinome^{23,24}. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint deshalb der Prozeß der chronischen Schleimhautschädigung, zum Beispiel im Rahmen einer Refluxösophagitis, ein Hauptfaktor für die Bildung des Barrett-Ösophagus und der anschließenden Tumorentstehung zu sein. Die chronische Schleimhautschädigung kann dabei auch als oxidative Stressreaktion beschrieben werden^{53,54}. Infolge eines längerdauernden Reizes, wie zum Beispiel einer Refluxkrankheit oder durch exogene Faktoren (Nahrung, Tabakrauch, Infektanfälligkeit), kommt es in der Speiseröhre reaktiv zu Regenerations- und Adaptionvorgängen. Gefährdet sind hierbei besonders die pluripotenten Stammzellen, vor allem bei fortbestehender Reizexposition. Durch anhaltende Einwirkung können auch an sich nicht toxische Substanzen zu schwerwiegenden Schäden führen. So postulierte Ames, daß eine Steigerung der Zellproliferation auch die Wahrscheinlichkeit für Mutationen erhöhe⁵⁵. Sie führe über Metaplasien zu Dysplasien und letztendlich zu einem Anstieg der nachweisbaren Tumore⁵⁶. Dabei stellen direkte DNA-Schäden, Mutationen, Onkogen-Aktivierung und die Inaktivierung von Suppressorgenen mögliche Mechanismen dar. Sie können inzwischen sowohl histologisch als auch molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Histologisch gesehen ist vor allem die Entstehung von Barrett-Epithel von Bedeutung. Unter Einbeziehung der bekannten Forschungsergebnisse könnte gegenwärtig von folgendem

Mechanismus bei der Entstehung des Barrett-Epithels ausgegangen werden: Der durch eine chronische Ösophagitis provozierte vermehrte Zellverlust bewirkt eine Verbreiterung der Proliferationszone. Durch lokale Stimulation von ‚Epithelial Growth Factor‘ wird die Epitheldicke erhalten oder gar vergrößert. Hierdurch werden die Stammzellen der Mukosa nach intraluminal verlagert und somit dem Reflux noch intensiver ausgesetzt. Gleichzeitig sind diese unreifen Zellen besonders sensitiv gegenüber den Noxen des Refluxats. Durch einen bisher noch nicht genau geklärten Mechanismus kommt es dann zur Ausbildung einer Zylinderepithelmetaplasie.

Molekularbiologisch wurde neben den endogenen Reizen, wie dem Reflux von Magen- und Dünndarmsaft, auch die Bedeutung anderer entzündungsfördernder Substanzen aufgezeigt. Neuere Studien belegen zum Beispiel den Einfluß einer Eisenexposition auf die Ösophagusschleimhaut^{53,56,57}. So wird unter anderem die Entstehung freier Radikale katalysiert und eine Epithelschädigung ermöglicht. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß es nach erfolgter Eisensubstitution zu einer deutlichen Ablagerung von Eisen in den eingewanderten Entzündungszellen (Makrophagen), dem distalen Ösophagus (Bereich der stärksten Entzündung und Zellproliferation) und um die Tumore herum kam. Dies kann als weiterer Hinweis auf eine direkte Beteiligung bei der Tumorentstehung gewertet werden. Inzwischen ist es auch möglich, einen erhöhten Level oxidativen Stresses anhand verschiedener Marker nachzuweisen. So finden sich zum Beispiel neben den freien Radikalen, wie zum Beispiel den ROS (reactive oxygen species), auch Radikalfänger wie die Superoxiddismutase oder das Glutathion. Beide wurden bereits im menschlichen Ösophagus⁵⁸, aber auch im Rattenmodell⁵⁹ dokumentiert. Weiterhin ließen sich als Folge einer gesteigerten Eisenaufnahme erhöhte Werte für die induzierbare Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) und das Nitrotyrosin finden. Letzteres stellt als irreversibles Reaktionsprodukt einen Kumulationsindex für die Bildung von Peroxidnitrat dar und wurde schon mehrfach in Verbindung mit der Induktion oxidativer Stressreaktionen gefunden⁵⁶. Weitere Parameter sind im Fettgewebe die TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance), an der DNA das 8-OH-dG (8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine) und bei den Proteinen Carbonyl-Komponenten⁵³. Ebenso finden sich die reaktiven Streßgene Hämoxxygenase 1 (HO1) und Metallothionein (MT) über der Norm. Ihre Synthese wird durch Faktoren wie Schwermetalle, UV- und Röntgenstrahlung sowie ROS-Bildung vorangetrieben. Da beide Gene normalerweise nicht im Ösophagus exprimiert werden, können erhöhte Werte als Schutzmechanismus bei bestehender Reizirritation verstanden werden. Die Zellen der betroffenen Regionen, vor allem

das Zylinderepithel, die Adenokarzinome und die Makrophagen, zeigten vermehrt die Expression des Transferrin-Rezeptors (TfR), welcher zusammen mit dem Transferrin selbst den Eisenstoffwechsel einer Zelle reguliert und als Zeichen einer gesteigerten Zellproliferation zu werten ist.

Während im Tiermodell die Eisenaufnahme wesentlich durch Substitution vorangetrieben wurde, könnten in der Praxis die veränderten Nahrungsgewohnheiten eine ausschlaggebende Rolle spielen. Vor allem der in den letzten Jahren stark zunehmende Fleischkonsum, mit einem hohen Anteil roter Muskulatur, könnte die erhöhten Eisenwerte begründen. Diese liegen besonders in Nordamerika und Europa weit über dem empfohlenen Grundbedarf. Die Tatsache, daß es sich dabei auch um die Regionen handelt, in denen das Adenokarzinom der Speiseröhre in den letzten Jahren derart drastisch angestiegen ist, unterstreicht einen möglichen Zusammenhang. In diesem Rahmen ist eine dänische Patientenstudie von Interesse, die die Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose mit einem gesteigerten Risiko für Ösophaguskarzinome in Verbindung bringt⁶⁰.

Abschließend gilt festzuhalten, daß die Idee einer durch Nitrosierung von Gallensalzen bedingten Karzinogenese eine sehr plausible Hypothese für die Karzinomentstehung im Speiseröhrenkrebsmodell der Ratte darstellte. Eine möglicherweise relevante bakterielle Besiedelung konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Somit wäre eine Umwandlung von primären Gallensäuren in Nitrosogallensäuren potentiell denkbar. Trotzdem machen die negative Testung der Intestinalsekrete auf Nitrosogallensäuren und generelle Genotoxizität diesen Ansatz unwahrscheinlich. Hingegen scheint vielmehr der Prozeß der chronischen Entzündung, in Form einer oxidativen Stressreaktion, eine bedeutende Rolle bei der Karzinogenese zu spielen. Weitere Studien sind aber notwendig, um diese Hypothese zu festigen und eine Relevanz der Tiermodelle für die Tumorentstehung beim Menschen zu zeigen.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz der ösophagealen Adenokarzinome ist stark angestiegen, wobei der ätiologische Zusammenhang mit der Refluxkrankheit gesichert ist. Eine Hypothese zur Tumorentstehung erwägt die endogene Bildung karzinogener *N*-Nitrosamide aus physiologisch vorliegenden Gallensalzen. Diese Hypothese sollte im Tiermodell überprüft werden.

In zwei Versuchsreihen wurden nach einer Reflux induzierenden Operation Veränderungen an Duodenalsekret und Darmschleimhaut untersucht. Dabei waren Bakterienwachstum, Anwesenheit von Nitroverbindungen, Gentoxizität und histologische Veränderungen von Interesse. Um mögliche Einflüsse auf die Bakterienflora zu eruieren, wurde das Trinkwasser modifiziert. Ein Ansäuern sollte die fehlende Magensäure ersetzen, der Zusatz von Antibiotika das Keimspektrum verändern. Weiterhin wurden Nahrung sowie die Exkremente näher untersucht. Anhand der durchgeführten Tests konnte gezeigt werden, daß es tatsächlich bereits nach kurzer Zeit zu einer bakteriellen Überwucherung kam. Dabei waren vor allem Fäkalkeime zu beobachten, wie zum Beispiel *E. coli*, *Proteus spp.* und *Enterococcus spp.*. Auch *Bacteroides spp.* zeigte sich stark erhöht. Alle gefundenen Keime wären in der Lage, eine Bildung von *N*-Nitroso-Gallensalzen zu katalysieren. Genauere chemische Analysen der physiologischen Darmsekrete konnten primäre Gallensalze nachweisen, widerlegten jedoch trotz sensitivster Untersuchungsmethoden die Anwesenheit von Nitroverbindungen. Auch ein gentoxisches Potential ließ sich in den biologischen Tests nicht nachweisen.

Es gilt somit festzuhalten, daß obwohl die Idee einer durch Nitrosierung von Gallensalzen bedingten Karzinogenese eine sehr plausible Hypothese für die Karzinomentstehung im Speiseröhrenkrebsmodell der Ratte darstellte, diese im Rahmen der Arbeit nicht belegt werden konnte. Das gänzliche Fehlen von Nitrosogallensäuren legt weiterhin den Schluß nahe, daß der vorher genannte Mechanismus in diesem Modell bei der Karzinogenese wohl keine Rolle spielt. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, daß der Prozess der chronischen Entzündung einen Schlüssel bei der Entstehung des Adenokarzinoms der Speiseröhre darstellt. Die stets nachweisbaren Entzündungszeichen, die notwendige Dauer der Reizexposition sowie der inzwischen mögliche Nachweis von Markersubstanzen des oxidativen Stress festigen diese Theorie. Weitere Untersuchungen sind jedoch zur genauen Klärung der multifaktoriellen Genese des Adenokarzinoms der Speiseröhre notwendig.

6. Literatur

1. Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. *JAMA* 1993; 270:1320-1320.
2. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96:1249-1256.
3. Byrne JP, Attwood SE. Duodenogastric reflux and cancer. *Hepatogastroenterology*. 1999; 46:74-85.
4. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265:1287-1289.
5. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N.Engl.J.Med.* 1985; 313:857-859.
6. Ollyo JB, Monnier P, Fontollet C, Savary M. The natural history, prevalence and incidence of reflux oesophagitis. *Gullet* 1993; 3 Suppl:3-10.
7. McDougall NI, Johnston BT, Kee F, Collins JSA, McFarland RJ, Love AHG. Natural history of reflux oesophagitis: a 10 year follow up of its effect on patient symptomatology and quality of life. *Gut* 1996; 38:481-486.
8. Fuchs KH, Freys SM, Heimbucher J, Fein M, Thiede A. Pathophysiologic spectrum in patients with gastroesophageal reflux disease in a surgical GI-function laboratory. *Dis.Esophagus* 1995; 8:211-217.
9. Provenzale D, Kemp JA, Arora S, Wong JB. A guide for surveillance of patients with Barrett's esophagus. *Am.J.Gastroenterol.* 1994; 89:670-680.
10. Sampliner RE, Hixson LJ, Fennerty MB, Garewal HS. Regression of Barrett's esophagus by laser ablation in an anacid environment. *Dig.Dis.Sci.* 1993; 38:365-368.
11. Overholt BF, Panjehpour M. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus: clinical update. *Am.J.Gastroenterol.* 1996; 91:1719-1723.

12. Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Role of the components of the gastroduodenal contents in experimental acid esophagitis. *Surgery* 1982; 92:276-284.
13. Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Alkaline esophagitis: a comparison of the ability of components of gastroduodenal contents to injure the rabbit esophagus. *Gastroenterology* 1983; 85:621-628.
14. Gillen P, Keeling P, Byrne P, Healy M, O'Moore PR, Hennessy TPJ. Implication of duodenogastric reflux in the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Br.J.Surg.* 1988; 75:540-543.
15. Champion G, Richter JE, Vaezi MF, Singh S, Alexander R. Duodenogastroesophageal reflux: relationship to pH and importance in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994; 107:747-754.
16. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. *Ann.Surg.* 1995; 222:525-531.
17. Vaezi MF, Richter JE. Synergism of acid and duodenogastroesophageal reflux in complicated Barrett's esophagus. *Surgery* 1995; 117:699-704.
18. Fein M, Ireland AP, Ritter MP, Peters JH, Hagen JA, Bremner CG, et al. Duodenogastric reflux potentiates the injurious effects of gastroesophageal reflux. *J.Gastrointest.Surg.* 1997; 1:27-33.
19. Pera M, Cardesa A, Bombi JA, Ernst H, Pera C, Mohr U. Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. *Cancer Res.* 1989; 49:6803-6808.
20. Attwood SE, Smyrk TC, DeMeester TR, Mirvish SS, Stein HJ, Hinder RA. Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery* 1992; 111:503-510.

21. Miwa K, Segawa M, Takano Y, Matsumoto H, Sahara H, Yagi M, et al. Induction of oesophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. *Br.J.Cancer* 1994; 70:185-189.
22. Ireland AP, Peters JH, Smyrk TC, DeMeester TR, Clark GW, Mirvish SS, et al. Gastric juice protects against the development of esophageal adenocarcinoma in the rat. *Ann.Surg.* 1996; 224:358-371.
23. Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, et al. Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int.J.Cancer* 1996; 67:269-274.
24. Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, Ireland AP, Öberg S, Ritter MP, et al. Duodeno-esophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J.Gastrointest.Surg.* 1998; 2:260-268.
25. Bulay O, Mirvish SS. Carcinogenesis in rat esophagus by intraperitoneal injection of different doses of methyl-n-amyl nitrosamine. *Cancer Res.* 1979; 39:3644-3646.
26. 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 Letters* 1995; 93:17-48.
27. Pera M, Trastek VF, Carpenter HA, Fernandez PL, Cardesa A, Mohr U, et al. Influence of pancreatic and biliary reflux on the development of esophageal carcinoma. *Ann.Thorac.Surg.* 1993; 55:1386-92.
28. Clark GW, Smyrk TC, Mirvish SS, Anselmino M, Yamashita Y, Hinder RA, et al. Effect of gastroduodenal juice and dietary fat on the development of Barrett's esophagus and esophageal neoplasia: an experimental rat model. *Ann.Surg.Oncol.* 1994; 1:252-261.
29. Mason RC. Duodenogastric reflux in rat gastric carcinoma. *Br.J.Surg.* 1986; 73:801-803.

30. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, et al. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis* 1997; 18:2265-2270.
31. Silverman SJ, Andrews AW. Bile acids: co-mutagenic activity in the salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test. Brief communication. *J.Natl.Cancer Inst.* 1977; 59:1557-1559.
32. Hill MJ. The role of colon anaerobes in the metabolism of bile acids and steroids, and its relation to colon cancer. *Cancer* 1975; 36:2387-2400.
33. Mirvish SS. The etiology of gastric cancer. Intra-gastric nitrosamide formation and other theories. *J.Natl.Cancer Inst.* 1983; 71:629-647.
34. Miwa K, Hattori T, Miyazaki I. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. *Cancer* 1995; 75:1426-1432.
35. Verdu E, Viani F, Armstrong D, Fraser R, Siegrist HH, Pignatelli B, et al. Effect of omeprazole on intragastric bacterial counts, nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds. *Gut* 1994; 35:455-460.
36. Thorens J, Froehlich F, Schwizer W, Saraga E, Bille J, Gyr K, et al. Bacterial overgrowth during treatment with omeprazole compared with cimetidine: a prospective randomised double blind study. *Gut* 1996; 39:54-59.
37. Poxon VA, Morris DL, Youngs DJ, Albutt EC, Keighley MR. Exposure to bile acids and bacteria over 24 hours following partial gastrectomy, vagotomy, and pyloroplasty. *World J.Surg.* 1986; 10:981-989.
38. Busby WF, Shuker DEG, Charnley G, Newberne PM, Tannenbaum SR, Wogan GN. Carcinogenicity in rats of the nitrosated bile acid conjugates *N*-nitrosoglycocholic acid and *N*-nitrosotaurocholic acid. *Cancer Res.* 1985; 45:1367-1371.
39. Schardey HM, Kamps T, Rau HG, Gatermann S. Bacteria: A major pathogenic factor for anastomotic insufficiency. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1994; 38:2564
40. Herderich M, Schroeder PL. HPLC-MS/MS in der Naturstoff- und Lebensmittelanalytik. *GIT Fachz.Lab* 1996; 9:841-845.

41. Stopper H, Müller SO. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxicology in Vitro* 1997; 11:661-667.
42. Zhang ZF, Kurtz RC, Yu GP, Sun M, Gargon N, Karpeh MJ, et al. Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: the role of diet. *Nutr.Cancer* 1997; 27:298-309.
43. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, et al. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J.Natl.Cancer Inst.* 1998; 90:150-155.
44. Vaughan TL, Farrow DC, Hansten PD, Chow WH, Gammon MD, Risch HA, et al. Risk of esophageal and gastric adenocarcinomas in relation to use of calcium channel blockers, asthma drugs, and other medications that promote gastroesophageal reflux. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 1998; 7:749-756.
45. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers.Prev.* 1998; 7:97-102.
46. Attwood SEA, Ball CS, Barlow AP, Jenkinson L, Norris TL, Watson A. Role of intragastric and intraoesophageal alkalinisation in the genesis of complications in Barrett's columnar lined lower oesophagus. *Gut* 1993; 34:11-15.
47. Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, et al. An inverse relation between cagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58:588-590.
48. Dayal B, Ertel NH. Studies on N-nitroso bile acid amides in relation to their possible role in gastrointestinal cancer. *Lipids* 1997; 32:1331-1340.
49. Guadagni S, Walters CL, Smith PL, Verزارo R, Valenti M, Reed PI. N-nitroso compounds in the gastric juice of normal controls, patients with partial gastrectomies, and gastric cancer patients. *J.Surg.Oncol.* 1996; 63:226-233.
50. Calmels S, Ohshima H, Henry Y, Bartsch H. Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. *Carcinogenesis* 1996; 17:533-536.

51. Calmels S, Bereziat JC, Ohshima H, Bartsch H. Bacterial formation of *N*-nitroso compounds from administered precursors in the rat stomach after omeprazole-induced achlorhydria. *Carcinogenesis* 1991; 12:435-439.
52. Puju S, Shuker DEG, Bishop WW, Falchuk KR, Tannenbaum SR, Thilly WG. Mutagenicity of *N*-nitroso bile acid conjugates in *Salmonella typhimurium* and diploid human lymphoblasts. *Cancer Res.* 1982; 42:2601-2604.
53. Chen X, Ding YW, Yang G, Bondoc F, Lee MJ, Yang CS. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000.Feb.;21.(2.):257.-63. 21:257-263.
54. Chen X, Mikhail SS, Ding YW, Yang G, Bondoc F, Yang CS. Effects of vitamin E and selenium supplementation on esophageal adenocarcinogenesis in a surgical model with rats. *Carcinogenesis* 2000.Aug.;21.(8.):1531.-6. 21:1531-1536.
55. Ames BN, Gold LS. Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 1990; 249:970-971.
56. Goldstein SR, Yang GY, Chen X, Curtis SK, Yang CS. Studies of iron deposits, inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in a rat model for esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1998; 19:1445-1449.
57. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, et al. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis* 1997; 18:2265-2270.
58. Wetscher GJ, Hinder RA, Bagchi D, Hinder PR, Bagchi M, Perdakis G, et al. Reflux esophagitis in humans is mediated by oxygen-derived free radicals. *Am.J.Surg.* 1995; 170:552-556.
59. Wetscher GJ, Perdakis G, Kretchmar DH, Stinson RG, Bagchi D, Redmond EJ, et al. Esophagitis in Sprague-Dawley rats is mediated by free radicals. *Dig.Dis.Sci.* 1995; 40:1297-1305.

60. Hsing AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Møller L, Wacholder S, Fraumeni JFJ. Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark. *Int.J.Cancer* 1995; 60:160-162.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Fein für seinen großen Einsatz bei der Bereitstellung, Durchführung und dem Abschluß dieser Arbeit. Sein Engagement, seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und seine Hilfsbereitschaft trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper, Institut für Toxikologie der Universität Würzburg, für die Durchführung der Gentoxizitätstests, sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Markus Herderich, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, für die Analyse der Gallensäuren.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Justus Müller, Pathologisches Institut der Universität Würzburg, danke ich für die Auswertung der histologischen Ergebnisse ebenso wie Herrn Dr. med. Michael Weig, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, für seine Hilfe bei der Begutachtung bakteriellen Wachstums. Nicht vergessen möchte ich all jene, die im Hintergrund an der Durchführung dieser Arbeit beteiligt waren, wie zum Beispiel dem Tierstall und dem Tier-Op der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität Würzburg.

Zuletzt danke ich meinen lieben Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung und Zuwendung, die ohne Zweifel auch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Wittmann
Vorname: Dominik
Geburtsdatum: 10.11.1973
Geburtsort: Würzburg
Religion: römisch-katholisch

Familienstand: ledig
Anschrift: Grimmstrasse 6
93049 Regensburg

Schulbildung:

1980-1984 Dreifaltigkeitsgrundschule, Amberg
1984-1990 St.-Michaels-Gymnasium, Metten
1990-1991 Glenstal Abbey School, Murroe, Co. Limerick (Irland)
1991-1993 St.-Michaels-Gymnasium, Metten / Abitur

Hochschulbildung:

11/1994 Studium der Medizin an der Universität zu Regensburg
08/1996 Ärztliche Vorprüfung
11/1996 Studium der Medizin an der Universität zu Würzburg
08/1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998-1999 Famulatur am Sacred Heart Hospital, Abeokuta (Nigeria)
09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2000 PJ-Tertial Innere Medizin: Missionsärztliche Klinik Würzburg
08/2000 PJ-Tertial Chirurgie: The Children´s Hospital, Dublin (Irland)
Klinikum Coburg
12/2000 PJ-Tertial Anästhesie: Klinikum Aschaffenburg
06/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 10/2001 AiP Anästhesie: KH der Barmherzigen Brüder Regensburg

Regensburg, den 06.02.2002