

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik

Klinikum rechts der Isar

Leitung: Prof. Dr. Roland M. Schmid

**Vergleich der laryngealen Expression von H⁺K⁺-ATPasen mit
der pharyngealen Säuremessung bei Patienten mit
laryngopharyngealen Beschwerden**

Romina Lisa Drabner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

1. Vorsitzender

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation

1. apl. Prof. Valentin Becker

2. Prof. Dr. Barbara Wollenberg

Die Dissertation wurde am 28.11.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2020 angenommen.

Publikation

Der Großteil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde durch die Autorin bereits in der unten genannten Publikationen veröffentlicht. Es erfolgt hierauf kein gesonderter Hinweis.

Becker V, **Drabner R**, Graf S, Schlag C, Nennstiel S, Buchberger AM, Schmid RM, Saur D, Bajbouj M.

New aspects in the pathomechanism and diagnosis of the laryngopharyngeal reflux-clinical impact of laryngeal proton pumps and pharyngeal pH metry in extraesophageal gastroesophageal reflux disease.

World J Gastroenterol. 2015 Jan 21;21(3):982-7. doi: 10.3748/wjg.v21.i3.982^[20].

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
1. Einführung	10
1.1. Reflux.....	10
1.1.1. Physiologischer Reflux	10
1.1.2. Gastroösophageale Refluxkrankheit.....	10
1.1.2.1. Definition	10
1.1.2.2. Einteilung.....	11
1.1.2.2.1. Montreal Klassifikation	11
1.1.2.2.2. Einteilung nach endoskopischen Befunden	11
1.1.2.3. Komplikationen	12
1.1.2.4. Therapie	14
1.1.3. Extraösophageale Manifestationen von Reflux.....	15
1.1.3.1. Chronischer Husten.....	15
1.1.3.2. Asthma	15
1.1.3.3. Zahnerosionen	16
1.1.3.4. Laryngitis	16
1.2. Laryngopharyngealer Reflux	17
1.2.1. Definition	17
1.2.2. Epidemiologie.....	17
1.2.3. Pathomechanismus.....	17
1.2.3.1. Unterscheidung LPR und GERD.....	18
1.2.3.2. Besonderheiten des Larynx	18
1.2.3.3. Mögliche Ursachen der Entstehung von LPR	19
1.2.4. Klinische Manifestationen.....	22
1.2.4.1. Symptome	22
1.2.4.2. Laryngoskopische Befunde	23
1.2.5. Differentialdiagnosen.....	24
1.2.6. Diagnostik	24
1.2.6.1. Klinische Diagnostik (Anamnese, Laryngoskopie).....	24
1.2.6.2. Weitere apparative Diagnostik	25
1.2.7. Komplikationen.....	26
1.2.8. Therapie.....	26

1.2.8.1. Allgemeine Maßnahmen	27
1.2.8.2. Medikamentöse Therapie.....	29
1.2.8.3. Operative Therapie.....	30
1.2.8.4. Endoskopische Therapieverfahren	31
1.3. Der Larynx	32
1.3.1. Aufbau.....	32
1.3.1.1. Makroskopischer Aufbau.....	32
1.3.1.2. Histologischer Aufbau	32
1.3.2. Funktion	32
1.3.3. Klinische Untersuchung.....	33
1.4. Dx-pH Messung	34
1.4.1. Unterscheidung zu bisherigen pH-Messungen	34
1.4.2. Anwendung	35
1.4.3. Auswertung der Untersuchung	35
1.5. H ⁺ K ⁺ -ATPase	38
1.5.1. Aufbau.....	38
1.5.2. Vorkommen.....	38
1.5.3. Funktion	38
1.5.4. Regulierung der HCl-Sekretion.....	39
1.5.5. Protonenpumpeninhibitoren	40
1.5.5.1. Wirkungsweise	40
1.5.5.2. Indikation	40
1.5.5.3. Unerwünschte Nebenwirkungen	40
1.6. Ziel dieser Arbeit	42
2. Material und Methoden	43
2.1. Patienten und klinische Untersuchungen	43
2.1.1. Diagnose LPR	43
2.1.2. ÖGD.....	43
2.1.3. Dx-pH Messung	44
2.1.4. pH- und Impedanz-Messung	44
2.1.5. Therapieversuch mit Protonenpumpeninhibitoren.....	45
2.2. Histologische und molekulare Untersuchungen.....	46
2.2.1. Materialien.....	46
2.2.2. Untersuchungsprotokolle.....	49
2.2.2.1. Fixierung der Gewebebiopsien und Anfertigung von Paraffinblöcken	49
2.2.2.2. Anfertigen der Paraffinschnitte	49

2.2.2.3. H.E.-Färbung.....	49
2.2.2.4. Immunhistochemie	50
2.2.2.5. Molekularbiologische Untersuchung	52
2.2.2.5.1. Nukleinsäure-Aufreinigung und Analytik	53
2.2.2.5.2. cDNA-Synthese	55
2.2.2.5.3. Real-time qPCR	56
3. Ergebnisse	61
3.1. Klinische Untersuchungen.....	61
3.1.1. Dx-pH Messung	61
3.1.2. pH- und Impedanzmessung	63
3.1.3. Therapieversuch mit Protonenpumpeninhibitoren.....	64
3.2. Histologische und molekulare Untersuchungen.....	66
3.2.1. H.E.-Färbung und Immunhistochemie	66
3.2.2. Real-time qPCR	69
3.3. Zusammenstellung der Ergebnisse	71
4. Diskussion.....	74
4.1. Bisherige Forschungsergebnisse	74
4.2. Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit	75
4.3. Limitationen dieser Arbeit.....	79
4.4. Ausblick und mögliche nachfolgende Studien	81
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis.....	85
Lebenslauf.....	103
Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

A

ADP	Adenosindiphosphat
ATF-3	Activating Transcription Factor 3
ATP	Adenosintriphosphat

B

BMI	Body Mass Index in kg/m ²
-----	--------------------------------------

C

°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
CTGF	Connective Tissue Growth Factor

D

DAB-Lösung	Diaminobenzidin-Lösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGR-1	Early Growth Response Factor 1
ERD	engl.: erosive reflux disease
Et-OH	Ethanol

F

FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
-------	----------------------------

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GERD	engl.: gastroesophageal reflux disease

GI-Trakt

Gastrointestinaltrakt

H

H ⁺	Wasserstoff-Ion
HCl	Wasserstoffchlorid
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
H.E.	Hämatoxylin und Eosin
H ⁺ K ⁺ -ATPase	Protonen-Kalium-Adenosintriphosphatase
HNO	Hals-Nasen-Ohren
Hz	Hertz
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

I

IHC	Immunhistochemie
-----	------------------

K

K ⁺	Kalium-Ion
----------------	------------

L

l	Liter
---	-------

M

M.	lat.: Musculus
mg	Milligramm
MII	engl.: multichannel intraluminal impedance
mmol	Millimol
MMP-1 und -2	Matrix Metalloproteinase 1 und 2

N

NERD	engl.: nonerosive reflux disease
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer

O

ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
-----	-----------------------------

P

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
P _i	Phosphat-Ion
pmol	Pikomol
PPI	Protonenpumpeninhibitor

Q

qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
------	--

R

RFS	Reflux Finding Score
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RSI	Reflux Symptom Index
RT	Raumtemperatur
rt qPCR	engl.: real-time quantitative PCR

T

TE-Puffer	TRIS-EDTA Puffer
TGF-β 1	Transforming Growth Factor beta-1
T _m	engl.: melting Temperature
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

UE	Untereinheit
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
------	------------------------------------

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Los Angeles Klassifikation ^[89]	12
Tabelle 2	Savary und Miller Klassifikation ^[151]	12
Tabelle 3	Reflux Symptom Index nach Belafsky et al. ^[22]	22
Tabelle 4	Reflux Finding Score nach Belafsky et al. ^[22, 23]	23
Tabelle 5	95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Sun et al. ^[215]	35
Tabelle 6	95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Feng et al. ^[75]	36
Tabelle 7	95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Chheda et al. ^[43]	36
Tabelle 8	95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Ayazi et al. ^[13]	36
Tabelle 9	Technische Geräte, verwendete Gegenstände und Verbrauchsmaterialien	46
Tabelle 10	Chemische Materialien	47
Tabelle 11	Monoklonale Antikörper der humanen Protonenpumpe für IHC	48
Tabelle 12	Zweiter Antikörper der Immunhistochemie (biotyniliert)	48
Tabelle 13	Verwendete Primer der real-time qPCR (humane H ⁺ K ⁺ -ATPase)	48
Tabelle 14	Verwendete Primer der real-time qPCR (Cyclophilin A)	48
Tabelle 15	Monoklonale Antikörper der humanen Protonenpumpe.....	51
Tabelle 16	Zweiter Antikörper der Immunhistochemie (biotyniliert)	51
Tabelle 17	Herstellung Master Mix der cDNA-Synthese.....	55
Tabelle 18	Thermocycler Programm der cDNA-Synthese.....	56
Tabelle 19	Verwendete Primer der real-time qPCR (humane H ⁺ K ⁺ -ATPase)	56
Tabelle 20	Magenkorpusbiopsie Verdünnungsreihe.....	57
Tabelle 21	Versuchsaufbau mit Standardkurve Magenkorpusbiopsie	58
Tabelle 22	Ablauf der real-time qPCR	59
Tabelle 23	Cyclophilin A Verdünnungsreihe	59
Tabelle 24	Verwendete Primer der real-time qPCR (Cyclophilin A)	60
Tabelle 25	Versuchsaufbau mit Standardkurve Cyclophilin A	60
Tabelle 26	Auswertung der gesamten Untersuchungen.....	72
Tabelle 27	Zusammenhang Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung .	73
Tabelle 28	Zusammenhang Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung .	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Dx-pH System zur oropharyngealen pH-Messung ^[220]	34
Abbildung 2	Sonde der oropharyngealen Dx-pH Messung ^[220]	35
Abbildung 3	HCl-Sekretion der Belegzellen des Magens	39
Abbildung 4	Endoskopie: postkrikoidaler Bereich des Larynx, Biopsieentnahme	44
Abbildung 5	Prinzip der ‚two step‘ qPCR (von der RNA über cDNA zur DNA)	52
Abbildung 6	96 Well Platte der real-time qPCR ^[2]	57
Abbildung 7	Oropharyngeale pH-Metrie mittels Dx-pH Messung, Normalbefund	62
Abbildung 8	Oropharyngeale pH-Metrie mittels Dx-pH Messung, pathologischer Befund	62
Abbildung 9	Verteilung der Werte des Ryan Scores in stehender und in liegender Position ...	63
Abbildung 10	Vergleich oropharyngeale Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung	64
Abbildung 11	Anteil der Patienten mit Symptomverbesserung unter PPI-Therapie	64
Abbildung 12	Skala der jeweiligen Symptomverbesserung unter PPI-Therapie	65
Abbildung 13	Drüsenepithel des Larynx von Patient Nr.6, HE-Färbung (I)	66
Abbildung 14	Drüsenepithel des Larynx von Patient Nr.6, HE-Färbung (II)	67
Abbildung 15	Immunhistochemische Färbung des Larynx von Patient Nr.6, α -UE	67
Abbildung 16	Immunhistochemische Färbung des Larynx von Patient Nr.6, β -UE	68
Abbildung 17	Magenmukosa Immunhistochemie α -UE (Positivkontrolle)	68
Abbildung 18	Magenmukosa Immunhistochemie β -UE (Positivkontrolle)	69
Abbildung 19	Relative Quantifizierung der α -Untereinheit mittels real-time qPCR.....	70
Abbildung 20	Relative Quantifizierung der β -Untereinheit mittels real-time qPCR.....	70

1. Einführung

1.1. Reflux

1.1.1. Physiologischer Reflux

Ein gastroösophagealer Reflux geringen Grades, bei welchem es weder zur Entwicklung von Krankheitssymptomen, noch zu einer mikroskopischen oder makroskopischen Schädigung des Ösophagusepithels kommt, kann als physiologisch angesehen werden. Verstärkt wird der Mechanismus des retrograden Transports von saurem Mageninhalt in den Ösophagus durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise dem Konsum von Koffein, Alkohol sowie Nikotin^[142].

1.1.2. Gastroösophageale Refluxkrankheit

1.1.2.1. Definition

Als gastroösophageale Refluxkrankheit (engl. gastroesophageal reflux disease, GERD) bezeichnet man jenen gastroösophagealen Reflux, welcher zu klinischen Symptomen wie Sodbrennen oder Regurgitationen führt, beziehungsweise eine histologisch nachweisbare oder makroskopisch sichtbare Schädigung der Ösophagasmucosa verursacht. Des Weiteren kann bei einem Teil der Betroffenen hierdurch auch die Entwicklung eines Barrett Ösophagus oder eines Karzinoms beobachtet werden^[142]:

In einigen klinischen Studien wurden Datenerhebungen hinsichtlich der Prävalenz der GERD in der westlichen Welt unternommen, wobei sich die Zahlen in einem Rahmen zwischen 10%^[223] und 30%^[107, 143] bewegten. Die Prävalenz des Barrett Ösophagus wurde in der erwachsenen Bevölkerung der westlichen Welt mit ca. 1–2% beschrieben^[188], wobei das entsprechende Karzinomrisiko (Entwicklung eines Adenokarzinoms des Ösophagus) hierdurch bei zwischen 0,10% und 0,15% pro Jahr^[54] liegt. Auffallend war, dass die Prävalenz in den letzten Jahren tendenziell ansteigend war^[107, 229], wobei gezeigt werden konnte, dass entsprechende Faktoren wie Übergewicht und ein männliches Geschlecht das Risiko, an einer GERD zu erkranken, deutlich erhöhen^[93].

1.1.2.2. Einteilung

Da unter dem Begriff GERD mehrere Krankheitsbilder zusammengefasst werden, wurden verschiedene Einteilungen festgelegt, um die einzelnen Befunde besser klassifizieren zu können.

1.1.2.2.1. Montreal Klassifikation

In der Montreal Klassifikation wird die GERD einerseits in typische, ösophageale und andererseits in atypische, extraösophageale Manifestationen eingeteilt. Erstere umfassen jene klinischen Symptome, welche sich refluxbedingt im Ösophagus präsentieren, wie beispielsweise Sodbrennen oder Regurgitationen, sowie auch mögliche daraus entstehende Krankheitsbilder (Refluxösophagitis, Barrett Ösophagus). Unter den atypischen, extraösophagealen Manifestationen werden Symptome, welche möglicherweise durch nach weiter proximal aufsteigende Säure im Rahmen einer GERD entstehen können, zusammengefasst^[233], unter anderem Formen des chronischen Hustens, Asthmaerkrankungen, die Entwicklung von Zahnerosionen sowie die Laryngitis. Eine Überlappung der Symptome ist möglich.

1.1.2.2.2. Einteilung nach endoskopischen Befunden

Endoskopisch können die morphologischen Auswirkungen des Rückflusses von saurem Mageninhalt auf die Schleimhaut des Ösophagus ermittelt werden und somit eine Einteilung in nicht-erosive Refluxerkrankung (engl. nonerosive reflux disease) und erosive Refluxerkrankung (engl. erosive reflux disease) vorgenommen werden:

NERD

Bei über der Hälfte der GERD Patienten (je nach Studie zwischen 50 und 85%) können trotz dem Vorhandensein von klinischen Refluxbeschwerden endoskopisch keine erosiven Veränderungen der Schleimhaut im Ösophagus festgestellt werden, es handelt sich demnach um eine ‚non-erosive reflux disease‘^[68].

ERD

Kommt es durch den gastroösophagealen Reflux zu endoskopisch erkennbaren Schleimhautveränderungen oder bioptisch nachweisbaren Läsionen wie erosiver oder ulzerierender Ösophagitis, Strikturen oder gar einem Barrett Ösophagus, spricht man von einer erosiven Refluxerkrankung^[82].

Um die endoskopisch erkennbaren Läsionen einzustufen, wurden in den letzten Jahrzehnten über 30 Systeme vorgestellt, von welchen sich zuletzt vor allem die Los Angeles Klassifikation sowie jene von Savary und Miller durchgesetzt und im klinischen Alltag am sinnvollsten gezeigt haben^[9, 10, 89, 145, 164] (heutzutage wird jedoch einheitlich eine Einteilung nach der Los Angeles Klassifikation empfohlen).

Tabelle 1 Los Angeles Klassifikation^[89]

A	eine (oder mehrere) Schleimhautläsion \leq 5mm, die sich nicht zwischen den Kuppen zweier Schleimhautfalten ausbreiten
B	eine (oder mehrere) Schleimhautläsion \geq 5mm, die sich nicht zwischen den Kuppen zweier Schleimhautfalten ausbreiten
C	eine (oder mehrere) Schleimhautläsionen die sich zwischen den Kuppen zweier oder mehrerer Schleimhautfalten ausbreiten, jedoch weniger als 75% der Circumferenz des Ösophagus' betroffen
D	eine (oder mehrere) Schleimhautläsionen, die über 75% der Circumferenz des Ösophagus betreffen

Tabelle 2 Savary und Miller Klassifikation^[151]

I	eine (oder mehrere) nichtkonfluierende gerötete Schleimhautläsionen, mit oder ohne Exsudat
II	erosive und exsudative Schleimhautläsionen des distalen Ösophagus, welche konfluieren, jedoch nicht die gesamte Zirkumferenz betreffen
III	Erosionen des distalen Ösophagus welche die gesamte Zirkumferenz betreffen, mit hämorrhagischen oder pseudomembranösen Exsudaten
IV	Vorhandensein von Komplikationen des Refluxes wie Ulzera, Stenosen oder Barrett-Ösophagus

1.1.2.3. Komplikationen

In Folge der rezidivierenden Reizung des Ösophagusepithels durch (sauren) gastro-ösophagealen Reflux können gravierende Komplikationen entstehen, welche endoskopisch unterschieden werden:

Stenose

Nach den ‚**MUSE**-Kriterien‘ werden mögliche pathologische Befunde im Bereich der Refluxösophagitis beschrieben, es handelt sich hierbei um ein Akronym der Veränderungen ‚**M**etaplasie‘, ‚**U**lkus‘, ‚**S**trikturen‘ und ‚**E**rosion‘^[9]. Je nach Vorliegen und Ausprägung der entsprechenden Befunde werden jeweils 0 bis 3 Punkte vergeben (kumulativ maximal 12 Punkte).

Die peptische Stenose, eine narbige Verengung der Speiseröhre bedingt durch chronischen gastroösophagealen Reflux, gehört zu den benignen Veränderungen im Bereich des Ösophagus und präsentiert sich klinisch unter anderem durch Vorliegen von Dysphagie oder Regurgitation unverdauter Nahrung^[169]. Sollte eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren bei den betroffenen Patienten keine ausreichende Symptomlinderung erbringen, stellt die endoskopische Dilatation eine mögliche und effektive Therapieoption dar^[141, 169, 177].

Barrett-Ösophagus

Die Umwandlung des physiologischerweise im Ösophagus vorkommenden, mehrschichtigen Plattenepithels in ein Zylinderepithel (= intestinale Metaplasie) durch chronische Reizzustände, beispielsweise in Folge einer ausgeprägten GERD, wird als Barrett Ösophagus bezeichnet. Dieser liegt meist im Bereich des distalen Ösophagus (am gastroösophagealen Übergang) und stellt eine fakultative Präkanzerose dar, weshalb Patienten mit entsprechenden Befunden eine regelmäßige endoskopische Verlaufskontrolle inklusive Histologiegewinnung empfohlen wird^[7, 66, 156, 202]. Weitere Komplikationen wie ein Barrett-Ulkus oder Strikturen können im Bereich der veränderten Mukosa zusätzlich auftreten.

Eine entsprechende Einteilung der endoskopischen Befunde erfolgt je nach Längsausdehnung in ‚short‘ (kleiner als 3cm) oder ‚long‘ (größer als 3cm) Barrett Ösophagus. Die Prävalenz des Barrett Ösophagus wird je nach Studie in der westlichen Gesellschaft mit 1–2%^[189, 251] angegeben, in den USA sogar mit durchschnittlich 5,6%^[101], wobei Männer doppelt so häufig wie Frauen hiervon betroffen sind^[52].

Eine Studie von Coleman et al. beschrieb einen Anstieg der Inzidenz des Barrett Ösophagus in der westlichen Welt um 159% im Zeitraum von 2002–2005 im Vergleich zum beobachteten Intervall in den Jahren 1993–1997^[49].

Ösophaguskarzinom

95% der diagnostizierten Karzinome der Speiseröhre können histopathologisch in Plattenepithelkarzinom sowie Adenokarzinom eingeteilt werden^[70]. Erstere treten in

Assoziation mit dem Konsum von Nikotin und Alkohol auf, wohingegen das Adenokarzinom in den Industrienationen führend ist^[140]. Ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung eines Adenokarzinoms des Ösophagus stellt die gastroösophageale Refluxerkrankung dar: eine Kohortenstudie mit 11.028 Patienten, bei welchen eine Barrett-Dysplasie diagnostiziert wurde, zeigte innerhalb des Untersuchungszeitraums von fünf Jahren eine Inzidenz des Adenokarzinoms von 0,12% jährlich^[111].

Die Diagnose wird endoskopisch sowie nach entsprechender histopathologischer Untersuchung der Biopsien gestellt, anschließend erfolgt die Einteilung nach der ‚TNM Klassifikation‘ (T=Tumorausdehnung, N=Lymphknotenbefall, M=Metastasierung). Die jeweiligen Therapiemaßnahmen zur Heilung der Erkrankung beziehungsweise Verlängerung der Überlebenszeit beinhalten je nach Tumorstadium endoskopische und operative Möglichkeiten, eine systemische Chemotherapie oder eine kombinierte Radiochemotherapie. Auch entsprechende palliative Maßnahmen wie eine Stent-Einlage oder Brachytherapie können in Erwägung gezogen werden.

Trotz unterschiedlicher Therapiemodalitäten ist das Adenokarzinom des Ösophagus weiterhin eine Tumorerkrankung mit hoher Letalität, so beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate je nach Tumorstadium nur ca. 20%^[161]. Umso wichtiger erscheint nach dem hier aufgeführten Pathomechanismen die Prävention der Tumorentstehung durch Reduktion der Anzahl der Erkrankungen an GERD sowie die frühzeitige Diagnostik einer Barrett-Dysplasie mit entsprechenden Therapiemaßnahmen.

1.1.2.4. Therapie

Die Therapie der GERD besteht aus verschiedenen Säulen: zu Beginn sollte jedem Patienten geraten werden, die möglichen individuellen Risikofaktoren für das Auftreten der Refluxbeschwerden zu verringern (siehe Kapitel 1.2.8.), insbesondere sei hier auf das Erreichen einer Gewichtsreduktion bei Adipositas^[81, 147] sowie das Schlafen mit erhöhtem Oberkörper durch das Verwenden mehrerer Kissen^[92, 211] hingewiesen. Zudem wird beispielsweise durch ein Vermeiden von später Nahrungsaufnahme kurz vor dem Zubettgehen eine Verbesserung der Symptomatik erhofft^[120, 165], wofür jedoch noch keine belegenden Studien vorliegen.

Eine generelle Diät Empfehlung kann nicht gegeben werden, jedoch sollte individuell die Aufnahme triggernder Nahrungsmittel bzw. der Konsum von Nikotin vermieden werden^[30, 59, 65, 120, 157]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte auch eine signifikante Besserung der Refluxbeschwerden durch eine gezielte Atemtherapie der

betroffenen Patienten gezeigt werden, wobei bisher noch unklar ist, durch welchen direkten Mechanismus es hierbei zur Symptomlinderung kommt ^[63].

Sollten diese Veränderungen des Lebensstils nicht zur Linderung der Symptome beziehungsweise histologisch nachweisbarer Reduktion der ERD führen, wird die medikamentöse Therapie, vorzugsweise mit Protonenpumpeninhibitoren oder H₂-Rezeptorantagonisten, empfohlen^[110, 123, 234, 244] (siehe Kapitel 1.5.5).

1.1.3. Extraösophageale Manifestationen von Reflux

In den letzten Jahren konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass der Ösophagus bei weitem nicht das einzige Organ des Menschen ist, welches durch den retrograden Transport von saurem Mageninhalt pathologisch verändert werden kann. So wird der nach proximal aufsteigende Reflux unter anderem auch als mögliche Ursache der Symptomatik von chronischem Husten^[112, 175], Asthmaerkrankungen^[97, 207], Zahnerosionen^[198] oder Formen der Laryngitis^[114, 200] angesehen.

1.1.3.1. Chronischer Husten

Es wird angenommen, dass chronischer gastroösophagealer Reflux zu einer vagalen Stimulation des distalen Ösophagus führt und somit durch einen ösophago-bronchialen Reflex ein chronischer Hustenreiz verursacht werden kann^[37, 112]. Erhalten diese Patienten eine Antireflux-Therapie, kommt es zum Sistieren der Beschwerden bei bis zu 75% der Betroffenen, wie Irwin et al. in ihrer Arbeit zeigen konnten^[112].

In einer anderen Studie wurden 152 Patienten, welche unter unspezifischem chronischen Husten litten, untersucht. Bei 56 der Patienten (37%) konnte eine GERD als Hauptursache des Hustens diagnostiziert werden, 24 der Betroffenen verhalf die alleinige Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren zur signifikanten Besserung der Beschwerden. Nach Erweiterung der Therapie, wie Etablierung einer Medikation mittels Prokinetika oder H₂-Blockern, konnte der Anteil der erfolgreich therapierten Patienten auf 79% erhöht werden^[175].

1.1.3.2. Asthma

Unter den an Asthma Erkrankten leiden je nach Studie 14–82% zusätzlich an einer GERD^[42, 50, 96, 124, 209, 235]. Die bedeutenden Unterschiede der weit auseinander liegenden

Zahlen hierbei liegen unter anderem an noch immer ungenauen und nicht eindeutig standardisierten Definitionen der GERD sowie sichtbaren geografischen Differenzen.

Der Pathomechanismus des Zusammenhangs der Asthmaerkrankung und des gastroösophagealen Refluxes ist noch Forschungsgegenstand, es wird jedoch davon ausgegangen, dass durch rezidivierende Mikroaspirationen von saurer Flüssigkeit eine erhöhte bronchiale Reagibilität entsteht und in Folge dessen durch einen erhöhten vagalen Tonus die spezifische Asthma-Symptomatik hervorgerufen wird^[96, 98].

1.1.3.3. Zahnerosionen

Schroeder et al.^[198] untersuchten 1995 in einer klinischen Studie 12 Patienten, welche unter idiopathischen Zahnerosionen wie Plaques, Zahnfleischschäden oder verfaulten und ausgefallenen Zähnen litten, hinsichtlich des Auftretens von gastroösophagealen Reflux. Bei 83% (10 von 12) konnte dieser mittels pH-Metrie bestätigt werden. Pace et al.^[168] werteten insgesamt 17 Studien aus, welche sich mit dem Auftreten von GERD bei Patienten mit massiven Zahnerosionen trotz regelmäßiger Mundhygiene befassten und kamen zu einer medianen Prävalenz der GERD von 32,5% mit einer Verteilung der Werte zwischen 21% und 83%.

1.1.3.4. Laryngitis

Gelangt rezidivierend saurer Mageninhalt nach proximal bis hinauf in den Larynx, kann es dort zur Entwicklung einer Inflammation kommen^[78, 128, 129]. Da die empfindliche Schleimhaut des Larynx bereits durch kurze Expositionszeiten und kleine Mengen der Säure geschädigt werden kann^[230], gestaltete es sich bislang schwierig, beweisende Studien über eine Korrelation der GERD sowie den Symptomen des sogenannten laryngopharyngealen Refluxes durchzuführen (siehe nächstes Kapitel).

1.2. Laryngopharyngealer Reflux

1.2.1. Definition

Als laryngopharyngealen Reflux bezeichnet man bisher den zu Symptomen führenden retrograden Transport von saurem oder nicht saurem Mageninhalt über den proximalen Ösophagus hinaus bis hin zu laryngealen und pharyngealen Strukturen^[129]. Kürzlich wurde die Definition erweitert und auch die Reizung der oberen Atemwege miteingeschlossen. Häufig beobachtete Symptome sind unter anderem Heiserkeit, ein Globusgefühl im Rachen, chronischer Husten oder auch übermäßiges Räuspern, welche jedoch nicht pathognomonisch für den LPR sind und somit eine klinische Diagnose erschweren^[78, 128, 218].

1.2.2. Epidemiologie

Aussagen über die exakte Prävalenz des laryngopharyngealen Refluxes sind schwer zu tätigen, da die Kriterien um einen LPR zu diagnostizieren, häufig variieren und schwer zu standardisieren bzw. vergleichbar sind. Hicks et al.^[105] untersuchten 105 freiwillige, gesunde Individuen auf Anzeichen von laryngopharyngealen Veränderungen welche durch einen Reflux verursacht werden könnten, und konnten bei bis zu 86% der Laryngoskopierte solchen Befunde feststellen. In einer Metaanalyse von Studien, welche oropharyngeale pH-Messungen durchführten, wurde hingegen bei 10–60% der Individuen ein LPR festgestellt^[21, 150]. Ozturk et al. untersuchten in ihrer Studie 43 Patienten welche unter Heiserkeit litten, sowie 20 gesunde Individuen mittels 24-Stunden-pH-Metrie und konnten in der ersten Gruppe bei 62,8% einen LPR diagnostizieren, wohingegen in der Gruppe der Gesunden lediglich bei 30% ein laryngopharyngealer Reflux festgestellt wurde^[167].

Unter allen Patienten, welche sich in Hals-Nasen-Ohren-Praxen vorstellen, leiden laut Koufman et al. ca. 10% unter Symptomen oder Befunden, welche durch einen laryngopharyngealen Reflux verursacht werden können^[38, 130, 230], laut Toohill et al. sind es immerhin 4%^[38, 224].

1.2.3. Pathomechanismus

Der Pathomechanismus, welcher zur Entstehung der Beschwerden des laryngopharyngealen Refluxes führt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und lässt noch immer

viele Fragen offen. Vor allem für die betroffenen Patienten wäre ein vollständiges Verständnis der Entstehung dieser Symptomatik sehr bedeutend, da die aktuell empfohlene Therapie des LPRs weiterhin keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigt. Die bisher am weitesten verbreitete Theorie der Krankheitsentstehung geht von einer Larynxschädigung durch gastroösophagealen Reflux aus, wobei eine fehlende Korrelation von LPR und GERD beschrieben wurde und diese Hypothese somit in Frage zu stellen ist^[21, 227].

1.2.3.1. Unterscheidung LPR und GERD

Der laryngopharyngeale Reflux wird, wie zuvor erwähnt, zu den atypischen Refluxerkrankungen gezählt, die in ihrer klinischen Manifestation Unterschiede zu den typischen Refluxbeschwerden aufweisen^[233]. Zum einen wurden bei Patienten, welche an einem LPR leiden, weniger oft Sodbrennen (nur ungefähr bei 40% der Patienten) oder eine histologisch darstellbare Inflammation des Ösophagus nachgewiesen, während diese jedoch die Hauptmerkmale einer GERD darstellen^[128, 129, 166, 241].

Des Weiteren weichen die klinischen Präsentationen der Symptome voneinander ab: während Refluxepisodes bei der GERD vor allem postprandial in liegender Position auftreten und auf eine Störung des unteren Ösophagussphinkters zurückzuführen sind, manifestiert sich der laryngopharyngeale Reflux hauptsächlich in aufrechter Haltung und unabhängig von der Nahrungsaufnahme^[128, 129, 173, 208, 241]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass typische bei der GERD auftretende Merkmale, wie die gestörte Motilität des Ösophagus und die verminderte ösophageale Clearance, beim LPR fehlen^[173, 176].

1.2.3.2. Besonderheiten des Larynx

In Folge der unterschiedlichen Funktionen von Larynx und Ösophagus bestehen einige histologisch nachweisbare Unterschiede zwischen den dort jeweils vorkommenden Epithelien, was sich auch in Hinblick auf die Resilienz gegenüber der Exposition mit Mageninhalt bzw. Säure beobachten lässt.

Die funktionelle Morphologie des Larynx erklärt ein Fehlen der natürlichen Clearance-mechanismen, welche einen eventuellen Reflux zeitnah beseitigen würden. Daher konnte gezeigt werden, dass in der Larynxmukosa bereits drei Refluxepisodes pro Woche zur Auslösung einer entsprechender Symptomatik führen können, während im Ösophagus bis zu 50 Episoden einer Säureexposition täglich als physiologisch angesehen werden^[128, 129, 173].

Bulmer et al. untersuchten in ihrer Arbeit von 2010 in vitro die Auswirkung von Säure und insbesondere Pepsin auf die Larynxschleimhaut von Schweinen und konnten bestätigen, dass das in Reflux vorkommende Pepsin auch bei höheren pH-Werten (zwischen Werten von 4 und 6), welche nicht mehr direkt schädigend auf die Mukosa einwirken, dennoch indirekt eine Veränderung der Zellen bewirkt^[33].

In Kombination mit den fehlenden Clearancemechanismen im Larynx würde dies bedeuten, dass eventuell nur kurz auftretende Refluxepisoden gravierende Schäden der Mukosa zur Folge haben können. Zuletzt sei noch auf die unterschiedliche zelluläre Expression von Carboanhydrasen im Epithel von Larynx und Ösophagus hingewiesen, Enzyme welche für die Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Werts im lokalen Milieu verantwortlich sind. Erstaunlicherweise konnten einige Autoren zeigen, dass eine abweichende Reaktion der jeweils vorkommenden Isoenzyme bei Refluxpatienten besteht: die reaktive Hochregulation der Enzymexpression in Folge eines stark verminderten lokalen pH-Werts bleibt in den Zellen des Larynx aus, während dieser natürliche Schutzmechanismus in Zellen des Ösophagus besteht^[11, 116].

1.2.3.3. Mögliche Ursachen der Entstehung von LPR

Wie zuvor beschrieben, ist der genaue Pathomechanismus der Erkrankung bisher noch unklar, wobei gezeigt werden konnte, dass sowohl direkte Mechanismen, wie beispielsweise die Auswirkung von Säure oder Pepsin^[11, 33, 116, 129, 173], als auch indirekte Mechanismen, wie beispielweise vagale Reflexe, zur Entstehung der Symptome bei laryngopharyngealem Reflux führen können^[133]. Verschiedene mögliche Pathomechanismen werden derzeit in klinischen und experimentellen Studien untersucht:

Oropharyngealer pH-Abfall durch säureproduzierende Bakterien

Haukioja et al. erforschten 2008 in vitro die resultierenden pH-Veränderungen, welche durch oropharyngeal vorkommende, probiotische Bakterien (beispielsweise Laktobazillen) durch die Verstoffwechslung verschiedener Zucker entstehen können^[100]. Sie konnten zeigen, dass einige Bakterienstämme, vor allem in Gegenwart von Glucose, einen signifikanten Abfall der lokalen pH-Werte bewirken, welcher eventuell als möglicher Pathomechanismus für die Entstehung der laryngopharyngealen Symptome angesehen werden kann.

Heterotrophe Magenschleimhaut

Eine kongenitale heterotrophe Magenschleimhaut im oberen Ösophagus kann zu Symptomen des laryngopharyngealen Refluxes führen^[85, 250], wie unter anderem Chong et al. in ihrer klinischen Studie zeigten: endoskopisch wiesen sie im Rahmen einer ÖGD bei 5,6% von 462 Individuen eine heterotrophe Magenschleimhaut im Ösophagus nach. In der Gruppe dieser 26 Patienten waren in den vorausgegangenen 12 Wochen bei 73% Symptome des laryngopharyngealen Refluxes aufgetreten, während unter den weiteren 436 (ohne Nachweis einer heterotrophen ösophagealen Magenschleimhaut) lediglich 26% von solchen Beschwerden berichteten^[45].

Basseri et al. berichteten vom Fall einer jungen Patientin, welche im Alter von 22 Jahren, ohne dem Vorhandensein von externen Risikofaktoren wie Rauchen oder regelmäßigem Konsum von Alkohol, an einem Larynxkarzinom erkrankte. Noch Jahre später, trotz Durchführung einer Fundoplikatio nach Nissen, persistierten die Symptome des atypischen Refluxes wie Asthma, Heiserkeit oder Sodbrennen und beeinträchtigten das Leben der jungen Patientin erheblich. Endoskopisch wurde schließlich eine heterotrophe Magenschleimhaut im proximalen Ösophagus, bei völlig unauffälliger distaler Speiseröhre, diagnostiziert und nach Entfernung selbiger konnte ein Sistieren der oben beschriebenen Symptome beobachtet werden^[17].

An Hand dieses Falles lässt sich zeigen, welches schwerwiegendes Ausmaß das Vorliegen einer heterotrophen Magenschleimhaut für den jeweiligen Patienten aufweisen kann, sodass es unabwendbar ist, zumindest differentialdiagnostisch an solch eine Pathologie bei den betroffenen Patienten zu denken, insbesondere da die endoskopisch feststellbare Prävalenz hierfür zwischen 1 und 10% angegeben wird^[1, 27, 113, 217].

Laryngeale Expression der H⁺K⁺-ATPase

Roussa et al. wiesen bereits im Jahre 1998 immunhistochemisch eine laryngeale Expression der H⁺K⁺-ATPase in Tieren nach, jedoch konnte ihr damals noch keine genaue klinische Bedeutung zugeordnet werden^[191, 192]. Wenige Jahre später begannen Altman et al. auch menschliches Larynxgewebe zu untersuchen. Im Jahre 2003 veröffentlichten sie ihre Arbeit, in welcher sie laryngeales Gewebe einer männlichen und weiblichen Leiche auf die Expression der H⁺K⁺-ATPase erforscht hatten. Bei beiden konnte mittels IHC der Nachweis von Protonenpumpen in den submukösen Drüsen des Larynx präsentiert werden^[4].

Nur zwei Jahre später konnten sie ihre zuvor durchgeführte Pilotstudie bekräftigen und publizierten die Ergebnisse von 15 immunhistochemisch untersuchten Laryngen (nach

Laryngektomie): in 93% (14 Laryngen) konnten mit Hilfe dieser Methode beide Untereinheiten der H⁺K⁺-ATPase nachgewiesen werden^[6].

Herrmann et al. analysierten in ihrer Publikation die Expression der H⁺K⁺-ATPase in sämtlichem menschlichen Gewebe und konnten im Larynx ebenfalls eine leicht Erhöhung der α-Untereinheit, nicht jedoch der β-Untereinheit, zeigen^[102].

Weitere Fragen bezüglich der Pathogenese des LPRs kamen auf, als eine Arbeitsgruppe in einem Kollektiv von 97 Patienten mit laryngopharyngealen Symptomen klar zeigen konnte, dass bei 50 Patienten (52%) in der dualen pH-Messung zwar ein Abfall des oropharyngeal gemessenen pH-Werts gesehen werden konnte, während bei nur 33% (32 Patienten) ein signifikanter Abfall des pH-Werts im distalen Ösophagus auftrat^[249]. Eine Entstehung der laryngopharyngealen Symptome durch einen gastroösophagealen Reflux war somit anzuzweifeln.

Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Becker et al. mit einer 2012 veröffentlichten Studie beschreiben: In einer erstmals kombinierten Untersuchung aus oropharyngealer pH-Messung mittels Dx-pH Messung sowie herkömmlicher, ösophagealer pH/MI-Messung stellten sie fest, dass die Korrelation zwischen dem Auftreten eines oropharyngeal gemessenen pH-Abfalls und jenem des proximalen Ösophagus nur sehr gering ist: in Zusammenhang mit den ösophageal gemessenen Refluxepisoden kam es nur bei 10,6% der Ereignisse zu einem korrelierenden pharyngealen pH-Abfall.

Würden die Symptome des LPRs in Folge eines Refluxes durch sauren Mageninhalt entstehen, so müsste eine Episode von niedrigen pH-Werten im Larynx mit einem messbaren Reflux in den proximalen Ösophagus korrelieren. Dies war jedoch bei lediglich 36,8% der beobachteten Ereignisse zu erkennen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Symptomverbesserung der an LPR leidenden Patienten welche pathologische Ergebnisse in der oropharyngealen Dx-pH Messung aufzeigten, durch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren nur in 16,6% erreicht wurde, sodass die mögliche Pathogenese der laryngopharyngealen Symptome auf Grund von gastroösophagealem Reflux in Frage zu stellen ist. Stattdessen könnte eine lokale Entstehung von Säure, wie beispielsweise durch eine laryngeale Expression der H⁺K⁺-ATPase oder säureproduzierende Bakterienstämme, diese klinische Symptomatik hinreichend erklären^[21].

1.2.4. Klinische Manifestationen

Sowohl klinische Symptome als auch laryngoskopisch feststellbare Veränderungen der Schleimhaut können bei den Erkrankten beschrieben werden und nicht selten resultiert hieraus eine belastende Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten^[51].

1.2.4.1. Symptome

Auffallend ist zunächst, dass im Gegensatz zur Symptomatik der gastroösophagealen Refluxerkrankung, vor allem tagsüber und in aufrechter Haltung entsprechende Beschwerden auftreten, jedoch nur von wenigen der Betroffenen ein typisches Sodbrennen berichtet wird^[78, 126, 127]. Laut Koufman et al. ist bei lediglich 43% der an LPR leidenden Patienten ein solches Symptom zu beobachten^[128].

Zu den häufigsten klinischen Anzeichen des laryngopharyngealen Refluxes gehören chronischer Husten, Fremdkörpergefühl im Hals, Heiserkeit oder Stimmstörungen, Räusperzwang sowie milde Schluckbeschwerden^[22, 128, 172, 218]. Zusätzlich berichten einige Autoren über weitere Beschwerden wie Asthmaformen, chronische Sinusitiden oder Halitosis^[21, 78]. Bisher wird die Häufigkeit der an LPR erkrankten Patienten durch die atypische Präsentation der Symptome noch stark unterschätzt, so wurde beispielsweise in einer Untersuchung von an Heiserkeit leidenden Patienten festgestellt, dass bei über 50% der Betroffenen die Beschwerden säureassoziiert waren^[78, 108].

Die typischen, bei LPR auftretenden Symptome sind, wie bereits erwähnt, leider nur sehr unspezifisch und stellen sowohl diagnostisch als auch therapeutisch eine Schwierigkeit für die behandelnden Ärzte dar. Belafsky et al. stellten zur Verbesserung der Diagnose-sicherung sowie zur Einschätzung des Therapieerfolgs den ‚Reflux Symptom Index‘ vor, welcher das Auftreten neun verschiedener Symptome im Verlauf des letzten Monats befragt. Je nach Schweregrad und Häufigkeit können null bis fünf Punkte vergeben werden, sodass letztlich eine Verteilung von null bis 45 Punkten resultiert^[22].

Tabelle 3 Reflux Symptom Index nach Belafsky et al.^[22]

1. Heiserkeit oder Stimmprobleme	0 1 2 3 4 5
2. Räusperzwang	0 1 2 3 4 5
3. sehr viel Schleim im Hals oder postnasale Sekretion	0 1 2 3 4 5

4. Schwierigkeiten Nahrung, Flüssigkeiten oder Tabletten zu schlucken	0 1 2 3 4 5
5. Husten nach Nahrungsaufnahme oder im Liegen	0 1 2 3 4 5
6. Atembeschwerden oder Hustenanfälle	0 1 2 3 4 5
7. Beschwerlicher oder lästiger Husten	0 1 2 3 4 5
8. Fremdkörpergefühl im Hals	0 1 2 3 4 5
9. Sodbrennen, Brustschmerzen, Verdauungsstörungen oder saures Aufstoßen	0 1 2 3 4 5

1.2.4.2. Laryngoskopische Befunde

Um einen LPR zu diagnostizieren, wird unter anderem eine Laryngoskopie durchgeführt. Auffallende Befunde, welche bei refluxbedingten Schädigungen laryngopharyngealer Strukturen auftreten können, werden unter anderem im ‚Reflux Finding Score‘ von Belafsky et al. zusammen gefasst (je nach Befund Vergabe von null bis 26 Punkten)^[23].

Tabelle 4 Reflux Finding Score nach Belafsky et al.^[22, 23]

1. subglottisches Ödem	2 falls vorhanden
2. ventrikuläre Obliteration	2 falls teilweise 4 falls komplett
3. Erythem / Hyperämie	2 falls im Bereich der Aryhöcker 4 falls diffus
4. Stimmlippenödem	1 falls gering, 2 falls mäßig 3 falls ausgeprägt 4 falls polypoid
5. diffuses Larynxödem	1 falls gering, 2 falls mäßig 3 falls ausgeprägt 4 falls obstruierend
6. Hypertrophie der hinteren Kommissur	1 falls gering, 2 falls mäßig 3 falls ausgeprägt 4 falls obstruierend
7. Granulome / Granulationsgewebe	2 falls vorhanden
8. zäher endolaryngealer Schleim	2 falls vorhanden

1.2.5. Differentialdiagnosen

Auf Grund bisher noch nicht vollständig standardisierter Diagnosekriterien, ist es bei Patienten mit dem Verdacht auf Vorliegen eines laryngopharyngealen Refluxes umso wichtiger, alle möglichen Differentialdiagnosen auszuschließen, hierdurch soll sowohl eine Über-, als auch eine Unterdiagnostik dieser Erkrankung vermieden werden und insbesondere können dadurch fakultative Präkanzerosen oder maligne Erkrankungen früh diagnostiziert werden^[222].

1.2.6. Diagnostik

Wie bereits erwähnt, existiert noch immer kein allgemein gültiger Goldstandard für die Diagnosestellung des laryngopharyngealen Refluxes. Meist wird auf Grund vorherrschender klinischer Symptomatik oder dem Nichtansprechen der Symptome auf eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren der Verdacht auf einen LPR gestellt, welcher durch die zusätzliche Durchführung einer Laryngoskopie intensiviert werden kann^[50].

1.2.6.1. Klinische Diagnostik (Anamnese, Laryngoskopie)

Zunächst erfolgt eine anamnestische Abklärung der zuvor genannten Symptome, wobei sich der Reflux Symptom Index von Belafsky et al. als geeignet erweisen konnte^[22]. Soweit möglich, sollte auch eine Laryngoskopie durchgeführt werden, um typische Veränderungen wie beispielsweise ein Ödem des Larynx, der Stimmlippen oder Pseudo-ulzera, festzustellen ^[55, 106].

Jedoch wurde die geringe Korrelation zwischen der auftretenden Symptomatik im laryngopharyngealen Bereich mit den laryngoskopisch sichtbaren Veränderungen und die geringe Standardisierung von einigen Autoren stark kritisiert, sodass endoskopische Techniken zur Diagnosestellung einer Erkrankung an LPR in Frage gestellt werden^[26, 28, 181]. Um die Reproduzierbarkeit der Erstellung pathologischer laryngopharyngealer Befunde zu erhöhen, sollte der Reflux Finding Score von Belafski et al.^[23] angewandt werden^[38] (siehe Kapitel 1.2.4.).

Des Weiteren wurde in Studien berichtet, dass insbesondere eine kombinierte Anwendung des RFS und des RSI sowohl zur Diagnosestellung eines laryngopharyngealen Refluxes als auch zur Kontrolle von Therapieerfolgen sinnvoll eingesetzt werden kann^[22, 182].

1.2.6.2. Weitere apparative Diagnostik

Da die beiden oben genannten Diagnosekriterien, Anamnese und Laryngoskopie, bedauerlicherweise weder eine hohe Spezifität noch eine hohe Sensitivität aufweisen, werden alternative Methoden gesucht, um einen LPR sicher nachzuweisen bzw. auszuschließen zu können:

pH-Metrie und Impedanzmessung

Um einen sauren oder nicht sauren Reflux in den Ösophagus (und möglicherweise auch nach weiter proximal in den Larynx) festzustellen, eignet sich insbesondere die kombinierte pH-Metrie des Ösophagus mit einer Impedanzmessung^[14, 29, 159]. Hierbei wird neben der 24-stündigen pH-Messung in der Speiseröhre auch eine Messung der Impedanz mit Hilfe mehrerer Elektroden durchgeführt.

Noordzij et al. wiesen in ihrer Studie eine mangelnde Korrelation zwischen dem Vorhandensein laryngopharyngealer Symptome und den messbaren Abfällen der pH-Werte in der kombinierten pH- und Impedanzmessung nach^[162]. Ursächlich hierfür stellen sie mehrere Hypothesen auf: eventuell könnte die Messung während der 24 Stunden nicht aussagekräftig genug sein, um zwischen an Refluxerkrankten und gesunden Individuen zu unterscheiden. Da bereits eine geringere Menge an Säure schädigend auf die Larynxmukosa wirkt^[128], könnte die durchgeführte Messung samt Auswertung der pathologischen Ergebnisse zu unspezifisch für die sichere Diagnostik des laryngopharyngealen Refluxes sein. Zudem verweisen sie auf mögliche Bias wie die Entstehung ähnlicher Symptome eines LPR, beispielsweise in Folge eines ausgeprägten Nikotinkonsums.

Eine zusätzliche oropharyngeale pH-Messung mittels Dx-pH Metrie könnte pathologische Befunde zur Diagnosestellung des LPR zuverlässiger aufzeigen, aktuell ist ihr Einsatz jedoch noch auf klinische Studien beschränkt (siehe Kapitel 1.4.). In neueren Studien wurde des Weiteren der Speichel von Patienten mit LPR untersucht, wobei ein kürzlich veröffentlichtes Review eine Korrelation bezüglich einer Pepsinerhöhung und dem Auftreten von laryngopharyngealen Symptomen beschrieb^[35]. Es zeigte sich diesbezüglich eine hohe Spezifität bei jedoch nur niedriger Sensitivität^[16]. Auch hier ist aktuell eine Beschränkung auf klinische Studien bestehend; wann und ob ein Einsatz dieser Tests im klinischen Alltag möglich ist, ist ebenfalls unklar.

Molekulare und histologische Untersuchung

Veränderte Speichelkonzentrationen von EGF^[62], auffallend hohe Mengen an antigenpräsentierendem CD1d und endogenem Glykophospholipid iGb3 in Larynxepithelien^[24], oder auch die veränderte Expression der Gene von beispielsweise TGF-β 1, VEGF, CTGF, FGF-2, EGR-1, ATF-3, MMP-1 und MMP-2^[248] konnten bisher bei an LPR leidenden Patienten festgestellt werden und mögen, wenn vielleicht auch nicht als diagnostisches, aber eventuell als therapeutisches Target, in Zukunft eine große Rolle spielen.

Betrachtet man zusätzlich histologische Veränderungen im Larynx dieser Patienten, so wiesen unterschiedliche Arbeitsgruppen eine auffallende Verbreiterung interzellulärer Räume nach. Dieses Phänomen kann auch bei GERD Patienten in der Ösophagus-schleimhaut beobachtet werden^[8, 80, 170, 183].

1.2.7. Komplikationen

Neben den bereits zuvor erwähnten Befunden wie Stimmlippengranulomen, subglottischen Stenosen oder auch Laryngospasmen, welche durch rezidivierende Säureexposition des Larynxepithels entstehen und symptomatisch werden können, diskutieren einige Autoren das gehäufte Auftreten von Larynxkarzinomen durch LPR, speziell bei Patienten mit negativer Nikotin- und Alkoholanamnese^[53, 152, 180, 229, 238].

Morrison et al.^[152] untersuchten sechs an Kehlkopfkarcinom erkrankte Patienten, welche nie zuvor geraucht hatten und auch keinen regelmäßigen Alkoholkonsum aufwiesen. Auf Grund weiterer klinischer Details bestand der Verdacht, dass die Karzinomentwicklung auf einen LPR rückzuführen sei. Außerdem bemerkten sie in einer Gruppe von an Kehlkopfkarcinom erkrankten Patienten mit negativer Nikotinanamnese eine höhere Prävalenz an Refluxereignissen (48%), als in einer Vergleichsgruppe von Kehlkopfkarcinom erkrankten mit positiver Raucheranamnese (16%). Andere Autoren beschrieben die Prävalenz von LPR bei Erkrankten mit Larynxkarzinomen mit 68%^[178], 83,3%^[86] und sogar 87%.

1.2.8. Therapie

Nach aktuellen Forschungsergebnissen sollte die optimale Therapie des laryngopharyngealen Refluxes aus einer Modifikation des Lifestyles des Patienten bestehen und gegebenenfalls mit einer bis zu sechsmonatigen, hochdosierten Gabe von Protonenpumpeninhibitoren kombiniert werden^[40, 60].

1.2.8.1. Allgemeine Maßnahmen

Da als Risikofaktor für laryngopharyngeale Beschwerden unter anderem ein gastraler Reflux bis in den proximalen Ösophagus und den Larynx angesehen werden kann, sollten all jene Verhaltensweisen vermieden werden, welche den Tonus des unteren Ösophagussphinkters verringern können und somit das Risiko eines Rückflusses von saurem oder nicht saurem Mageninhalt erhöhen^[58].

In einer Metaanalyse, welche 2006 veröffentlicht wurde, untersuchten Kaltenbach et. al.^[120] 100 zuvor durchgeführte Studien hinsichtlich verschiedener Maßnahmen, um einen gastroösophagealen Reflux signifikant zu verringern:

Rauchen

Sowohl in klinischen Studien (mit Verwendung von Fragebögen bezüglich des Auftretens von Refluxsymptomen), als auch in der direkten Messung des pH-Werts im Ösophagus, konnte eine Assoziation von Refluxereignissen mit Nikotinkonsum gezeigt werden^[41, 61, 119, 239].

Ein Verringern desselben könnte somit das Auftreten von Refluxepisoden verhindern, was jedoch in einer Studie von Schindlbeck et al. nicht belegt werden konnte^[197].

Alkohol

Der Konsum von Alkohol kann den gastroösophagealen Reflux steigern und sollte somit insbesondere bei diesen Patienten minimal gehalten werden^[32, 121, 193, 236].

Schokolade

Eine geringe Assoziation zwischen dem Verzehr von Schokolade und dem Auftreten von Refluxsymptomen scheint vorhanden zu sein, dies konnte bisher jedoch nur in kleinen klinischen Studien beobachtet werden^[153, 245]. Es fehlen große randomisierte Studien, welche diese Aussage verifizieren können.

Kohlensäurehaltige Getränke

Es konnte gezeigt werden, dass durch kohlensäurehaltige Getränke der Reflux von Magensäure gesteigert werden kann^[73, 149], allerdings fehlen auch hier weitere Studien, welche die Reduktion der entsprechenden Symptome unter Karenz dieser Auslöser beweisen können.

Saure Getränke und Nahrungsmittel

Der Verzehr von Zitrusfrüchten wird häufig mit dem Auftreten von Refluxbeschwerden in Verbindung gebracht^[74], jedoch konnte bisher keine ausreichende Korrelation gezeigt werden und auch bezüglich des Pathomechanismus der Gewebeschädigung bleiben Unklarheiten wie Price et al. in einer Studie bewiesen: selbst ein Orangensaft mit zuvor angehobenem pH-Wert auf 7 wirkt sich nach Kontakt mit dem Ösophagusepithel negativ auf die Refluxsymptomatik aus^[179].

Koffein

Gleichermaßen weichen in Hinsicht auf den Verzehr von Kaffee und anderen koffeinhaltigen Getränken die vorhandenen Studienergebnisse voneinander ab, so berichten unter anderem Cohen et. al.^[47, 48] von einem Zusammenhang der erwähnten Getränke mit Refluxbeschwerden, während andere Autoren dies nicht bekräftigen konnten^[25, 213, 237].

Scharfe Speisen

Der Verzehr von scharfen Speisen gilt als begünstigender Faktor der Refluxsymptome, wurde jedoch bisher in keiner Studie untersucht.

Adipositas

Durch das Vorliegen von Adipositas ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) wird das Auftreten von Refluxsymptomen signifikant gesteigert^[79, 154, 155, 160], dies konnte durch Messung des ösophagealen pH-Werts objektiviert werden^[216]. Im Umkehrschluss würde eine Gewichtsreduktion eine Reduktion der auftretenden Refluxbeschwerden begünstigen. Fraser-Moodie et al.^[81], ebenso wie Mathus-Vliegen et al.^[147], konnten in klinischen Studien eine signifikante Verringerung des gastroösophagealen Refluxes nach einer Gewichtsabnahme ihrer Patienten zeigen. Übergewichtigen Personen, welche unter refluxassoziierten Symptomen leiden, sollte somit unbedingt eine langsame Gewichtsreduktion empfohlen werden.

Späte Mahlzeiten vor dem Schlafen

Späte Mahlzeiten (kurz vor dem Schlafen gehen) gelten als weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer Refluxerkrankung auf Grund von hierdurch resultierenden nächtlichem Reflux und verminderten pH-Werten im Ösophagus. Auch diesbezüglich fehlen jedoch Studien, welche diese Hypothese bekräftigen können^[120, 165].

Schlafen mit flachem Oberkörper

Durch flaches Liegen kann der Reflux von saurem Mageninhalt in den Ösophagus gesteigert werden: es konnte eine signifikante Reduktion des ösophageal gemessenen pH-Werts bei flach liegenden Individuen beobachtet werden^[92, 211]. Den Patienten mit Refluxbeschwerden sollte somit geraten werden, nachts mit erhöhtem Oberkörper zu schlafen.

1.2.8.2. Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der Refluxerkrankung besteht, wie bereits erwähnt, in der Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren, welche gegebenenfalls um eine zusätzliche Gabe von Antacida oder H₂-Blockern erweitert werden kann^[196, 246].

Protonenpumpeninhibitoren

Durch Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren wird die Produktion von Magensäure reduziert (siehe Kapitel 1.5.), wodurch im Falle eines Refluxes von Mageninhalt weniger saure Flüssigkeit nach proximal in den Ösophagus gelangt. Hierdurch wird erhofft, die durch Reflux assoziierten Symptome und Komplikationen, nicht nur im Rahmen einer GERD sondern auch möglicherweise beim Auftreten von laryngopharyngealen Beschwerden, zu verringern bzw. zu verhindern^[146]. In diversen Studien wurde versucht, eine Verbesserung der Symptome des laryngopharyngealen Refluxes unter PPI-Therapie gegenüber der Gabe von Placebopräparaten zu beweisen, was jedoch bisher meist erfolglos blieb^[64, 69, 163, 214, 230, 243]. Andererseits konnten Arbeitsgruppen wie Lam et al. sowie Reichel et al. neben einem Placeboeffekt doch einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der auftretenden Symptomatik und teils auch der objektivierbaren Untersuchungsergebnisse in der Laryngoskopie durch die Therapie mit den Protonenpumpeninhibitoren Esomeprazol, Lansoprazol und Rabeprazol zeigen^[69, 135, 182].

Einige Autoren weisen darauf hin, dass auf Grund der erhöhten Empfindlichkeit der Larynxmukosa im Gegensatz zur Mukosa des Ösophagus, eine intensiviertere und prolongierte Therapie mit PPIs (3-6 Monate) erfolgversprechender sein könnte^[22, 88, 95, 129, 171].

H₂-Blocker

Eine zusätzliche Therapieoption stellen H₂-Antagonisten dar: durch Blockade des Histamin-Rezeptors der Parietalzellen in der Magenschleimhaut wird die Bildung von Magensäure reduziert und somit ebenfalls ein positiver Effekt auf die Refluxsymptomatik

erhofft^[72, 129, 186, 247]. Bisher gibt es allerdings nur wenige Studien, in welchen die direkte Wirkung der H₂-Antagonisten in Hinblick auf laryngopharyngeale Beschwerden untersucht wurde. Eine dieser Studien ist die Arbeit von Park et al.: jeweils 30 an einem LPR erkrankte Patienten wurden für zwei Monate entweder mit einer PPI-Monotherapie oder mit einer Kombinationstherapie aus PPI und H₂-Antagonist therapiert. Nach Ablauf der 2 Monate konnte in beiden Gruppen bei jeweils 50% (15 Patienten) eine signifikante Linderung der Beschwerden (definiert als eine Symptomreduktion um 50% ausgehend von der Baseline) gezeigt werden. Somit war kein Unterschied in Hinblick auf die Einnahme eines H₂-Antagonisten zu beschreiben^[171].

Antacida

Eine andere, seltener eingesetzte Option zur Behandlung von typischen und atypischen Refluxbeschwerden stellen unterschiedliche Formen von Antacida dar. McGlashan et al. untersuchten in einer Pilotstudie die Wirksamkeit eines Antacidums (Gaviscon® Advance) bei Patienten mit diagnostiziertem LPR in der Hoffnung, hierbei zufriedenstellendere Ergebnisse als durch die beiden zuvor genannten Therapieoptionen zu erlangen: sie konnten eine signifikante Besserung der klinischen Symptome (im Reflux Symptom Index) sowie der laryngoskopisch kontrollierten Befunde (mittels Reflux Finding Score) in der Gruppe der mit diesem Antacidum behandelten 24 Patienten im Vergleich zu den 25 Patienten der Kontrollgruppe (keine Therapie) zeigen^[148].

1.2.8.3. Operative Therapie

Einige Autoren empfehlen auch bei diesen, von laryngopharyngealem Reflux betroffenen Patienten, im Falle eines konservativen Therapieversagens die chirurgische Durchführung einer Fundoplikatio nach Nissen (360° Manschette) oder Toupet (270° Manschette, Gastropexie)^[125, 240].

Eine von Sahin et al. veröffentlichte Studie beschreibt in Folge laparoskopischer Anti-reflux-Operationen eine signifikante Reduktion der klinischen Symptome (gemessen anhand der bereits erläuterten Scores RSI und RFS): präoperativ wurde bei 41 Patienten mit laryngopharyngealem Reflux ein mittlerer RSI von $22,8 \pm 7,4$ Punkten ermittelt, während dieser postoperativ auf $12,9 \pm 6,4$ Punkte gesenkt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mittels Dokumentation des RFS gezeigt werden, so lag dieser innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs präoperativ bei $10,6 \pm 2,3$ Punkten und wurde postoperativ mit deutlich rückläufigen $6,9 \pm 2,0$ Punkten berechnet^[195].

1.2.8.4. Endoskopische Therapieverfahren

Minimalinvasive, endoskopische Therapieverfahren könnten eine Alternative zur monate- bis jahrelangen PPI-Einnahme und zur, wenn auch laparoskopisch durchführbaren, aber weiterhin invasiven, operativen Therapie mittels Fundoplikatio darstellen. Aufgeführt werden hier unter anderem die bei der GERD untersuchten Möglichkeiten der endoskopischen Injektionstherapie in den unteren Ösophagus-sphinkter (Muscularis oder Submucosa) mittels Enterxy^[46, 174] oder Plexiglas-Microsphären^[76], wobei für beide Methoden kaum klinische oder experimentelle Daten vorliegen und entsprechende Studien aktuell noch fortgeführt werden. Die endoskopische Applikation von Radiofrequenzenergie ist eine weitere Therapieoption, wobei hier der genaue Wirkmechanismus noch ungeklärt ist und auf eine Reduktion der Frequenz transienter Sphinkterrelaxationen zurück zu führen sein könnte. Die Erfolgsquote (gemessen an einem Absetzen der zuvor benötigten PPI-Therapie sechs Monate nach Intervention) lag in einer Studie von 47 untersuchten Patienten bei 87% ^[225]. Weitere alternative Verfahren stellen die endoskopische Gastroplicatio^[77] und die endoskopische intraluminale Valvuloplastik (kombiniert endoskopisch und laparoskopisch)^[56] dar, wobei beide technisch sehr aufwändig beschrieben werden und teils nur tierexperimentelle Studien vorliegen.

1.3. Der Larynx

1.3.1. Aufbau

Zwischen der menschlichen Trachea, welche Atemluft von der Lunge weg, bzw. zur Lunge hin transportiert und dem weiter oral gelegenen Pharynx liegt der Larynx (Kehlkopf)^[212].

1.3.1.1. Makroskopischer Aufbau

Der Larynx besteht hauptsächlich aus Knorpeln, welche durch verschiedene Ligamente, fibröse Membranen und zahlreiche Muskeln (innerviert durch den Nervus Vagus), miteinander verbunden sind. Die arterielle und venöse Versorgung des Larynx geschieht durch die Vasa laryngea superiores et inferiores^[212].

1.3.1.2. Histologischer Aufbau

Fast der gesamte Larynx ist von einer kontinuierlichen, hochsensiblen Schleimhaut ausgekleidet, welche durch ein pseudostratifiziertes, respiratorisches Epithel mit Zilien gebildet wird. Das Epithel der Stimmfalten unterscheidet sich jedoch hiervon: durch die mechanische Belastung der Stimmfalten, handelt es sich hier um ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Zusätzlich kommt jenes mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel auch an den Übergängen zum Hypopharynx und der oralen Oberseite der Epiglottis vor, da es durch den Nahrungsbrei beim Schluckvorgang hier ebenfalls zu einer ausgeprägten Beanspruchung der Schleimhaut kommt. Muköse Drüsen sind vor allem auf der oralen Epiglottisseite sowie in den aryepiglottischen Falten vorhanden^[212].

1.3.2. Funktion

Die Funktion des Larynx besteht unter anderem darin, die Atemwege beim Schluckakt abzuschließen, um ein Eindringen von Nahrungsbrei in die Trachea zu verhindern. Außerdem beinhaltet er eine Sphinkterfunktion um die Ventilation der Lunge durch Weit- bzw. Engstellung zu regulieren. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass ein festes Zupressen der Epiglottis den intrathorakalen Druck deutlich erhöhen kann, was bei starker körperlicher Anstrengung, wie beispielsweise beim Tragen von schwerer Last oder während des Geburtsvorgangs, eine Rolle spielt. Zu seinen bedeutsamsten

Aufgaben gehört außerdem die Grundlagenschaffung für die wichtigste Methode der menschlichen Kommunikation: die Sprachproduktion^[212].

1.3.3. Klinische Untersuchung

Der Larynx des Patienten kann durch verschiedene Methoden inspiziert werden. Zum einen mit Hilfe eines Larynxspiegels oder durch flexible, nasale sowie starre, orale Endoskopie. Sichtbar sein sollten hierbei die Plicae vestibulares, die Plicae vocales sowie die Rima glottidis. Des Weiteren können die einzelnen Strukturen des Larynx bei spezifischeren Fragestellungen durch bildgebende Verfahren wie Computertomografie und Magnetresonanztomografie dargestellt werden^[212].

1.4. Dx-pH Messung

Eine Weiterentwicklung der bisherigen, ösophagealen pH-Messung in der Diagnostik der Refluxerkrankungen, stellt die Restech™ Dx-pH Methode (Respiratory Technology Corporation, San Diego, Kalifornien, USA) dar:



Abbildung 1 Dx-pH System zur oropharyngealen pH-Messung^[220]

1.4.1. Unterscheidung zu bisherigen pH-Messungen

Der Dx-pH Katheter bietet die Möglichkeit, bei Patienten eine 24–48 Stunden andauernde pH-Messung über den Ösophagus hinaus im Rachen durchzuführen und somit minimal-invasiv eine laryngopharyngeale Säureexposition nachzuweisen^[94, 215, 242]. Durch einen nasopharyngealen Katheter wird die pH-Sonde, welche zuvor in Lösungen mit pH-Werten von 4 und 7 kalibriert wurde, auf Höhe der Uvula platziert.

Die tropfenförmige Spitze des Katheters enthält ein LED-Licht zur Sicherstellung der exakten Lage sowie den Sensor für die pH-Messung, welcher aerosolisierte pH-Werte im Abstand von 0,5 Sekunden (2 Hz) misst. Um festzustellen, ob eventuell detektierte pH-Wert-Veränderungen durch einen Reflux von (saurem) Mageninhalt begründet werden, sollte parallel hierzu eine distale, d.h. 5 cm oberhalb des unteren Ösophagussphinkters liegende, pH-Messung stattfinden^[83]. Die gemessenen Werte werden mittels W-LAN an einen vom Patienten mitgeführten Rekorder gesendet und können anschließend mit einer speziellen Software am Computer ausgewertet werden.



Abbildung 2 Sonde der oropharyngealen Dx-pH Messung^[220]

1.4.2. Anwendung

Wie bereits erwähnt, bietet diese neuartige Methode ein minimal-invasives Verfahren um eine Säureexposition des laryngopharyngealen Bereichs festzustellen^[231], der Patient ist während der empfohlenen Messzeit von mindestens 24 Stunden kaum in seinem Alltag eingeschränkt und das unaufwändige Verfahren kann schon bei Säuglingen und Kleinkindern^[31] angewandt werden.

1.4.3. Auswertung der Untersuchung

Die mittels Dx-pH Messung dokumentierten pH-Werte zeigen eine eventuell vorhandene Säureexposition im Larynx des Patienten und können somit zur Diagnose eines LPR dienen: Sun et. al beobachteten einen geringen laryngealen pH-Wert-Abfall in gesunden, asymptomatischen Patienten ^[215], wobei die 95. Perzentile der gemessenen Werte folgendermaßen lagen:

Tabelle 5 95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Sun et al.^[215]

pH-Werte	distale Sonde	oropharyngeale Sonde
< 4,0	4,52%	0,02%
< 5,0	10,91%	2,33%
< 6,0	42,99%	21,41%

In einer ähnlichen Studie untersuchten Feng et al. 29 gesunde Individuen (medianes Alter 23 Jahre) mittels Restech™ Dx-pH Messung und stellten folgende Werte der 95. Perzentilen fest^[75]:

Tabelle 6 95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Feng et al.^[75]

pH-Werte	oropharyngeale Sonde
< 4,0	0,06%
< 4,5	1,01%
< 5,0	7,23%
< 5,5	27,32%

Chheda et al. untersuchten den laryngealen pH-Wert 20 gesunder asymptomatischer Individuen^[43]:

Tabelle 7 95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Chheda et al.^[43]

pH-Wert	oropharyngeale Sonde
< 4,0	0,2%
< 4,5	7,4%
< 5,0	10,7%
< 5,5	16,6%

2009 publizierten Ayazi et al. ihre klinische Studie, in welcher sie bei 55 gesunden und asymptomatischen Individuen eine laryngeale pH-Messung mittels Dx-pH Methode durchführten und unterscheiden dabei zusätzlich zwischen liegend und in aufrechter Position gemessener Werte^[13]:

Tabelle 8 95. Perzentile gemessener pH-Werte nach Ayazi et al.^[13]

pH-Wert	liegend	aufrecht
< 4,0	1,26%	0,00%
< 4,5	1,54%	0,00%
< 5,0	5,15%	0,021%
< 5,5	23,9%	0,133%
< 6,0	55,1%	6,29%
< 6,5	77,9%	32,9%

Anhand der hier aufgezeigten unterschiedlichen Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen ist zu erkennen, dass die 95. Perzentilen der gesunden Normalbevölkerung durchaus voneinander abweicht. Dies kann unter anderem an unterschiedlichen Messbedingungen liegen, sollte jedoch bei der Auswertung der jeweiligen pH-Werte in der Diagnostik der Refluxerkrankungen unbedingt beachtet werden. Hinzuzufügen sei auch, dass eine isolierte Beachtung der oropharyngeal gemessenen pH-Werte ohne begleitende klinische Symptomatik keine sinnvolle Aussage erbringen kann.

1.5. H⁺K⁺-ATPase

1.5.1. Aufbau

Die H⁺K⁺-ATPase, ein oligomerer Heterodimer, gehört zur Familie der P₂-Typ ATPasen^[102, 194]. Sie wird aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt: einer großen, katalytischen α-Untereinheit^[15, 103, 204], welche mit ihren 10 transmembranösen Teilen unter anderem den Ionenkanal des Enzyms und die Phosphorylierungsstelle der H⁺K⁺-ATPase^[91, 102] bildet, sowie einer kleineren, weniger bedeutenden β-Untereinheit^[103, 184]. Als membranständiges Enzym katalysiert sie die H⁺-Sekretion der Parietalzellen im Magen^[5, 228].

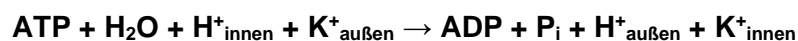
1.5.2. Vorkommen

Die humane H⁺K⁺-ATPase wird zur Bildung von Salzsäure in den Parietalzellen des Magens exprimiert. Herrmann et al. untersuchten in ihrer Arbeit sämtliche Organe des gesunden menschlichen Körpers bezüglich eines weiteren Vorkommens dieser ATPasen^[102]. Es konnte eine geringe Expression der α-Untereinheit im Kleinhirn und in den Nebennieren mittels TaqMan PCR festgestellt werden, was jedoch mittels IHC und Western Blot nicht bekräftigt werden konnte.

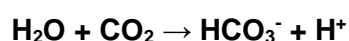
Eine Expression der α-Untereinheit in den Nieren konnte durch sie jedoch nicht bestätigt werden, dies war zuvor von anderen Arbeitsgruppen entdeckt worden^[34, 131].

1.5.3. Funktion

Unter Verbrauch von ATP wird ein Kalium-Ion in die Belegzelle des Magens transportiert. Gleichzeitig gelangt ein Wasserstoff-Ion aus der Zelle ins Magenlumen, um sich dort mit einem Chlorid-Ion, welches passiv ins Lumen gelangt, zu Salzsäure (H⁺Cl⁻) zusammen zu lagern.



Das Wasserstoff-Ion wurde zuvor mit Hilfe der Carbonhydrase innerhalb der Belegzelle aus einem Molekül Wasser und Kohlenstoffdioxid gebildet:



Das dabei ebenfalls entstehende Hydrogencarbonat-Ion (HCO_3^-), kann nun gegen ein Chlorid-Ion mit dem Blutplasma eingetauscht werden. Durch den Mechanismus der Rezirkulation gelangt das Kalium-Ion wieder in das Lumen des Magens zurück, sodass ein Kreislauf ohne den Verlust von Kalium entstehen kann^[84].

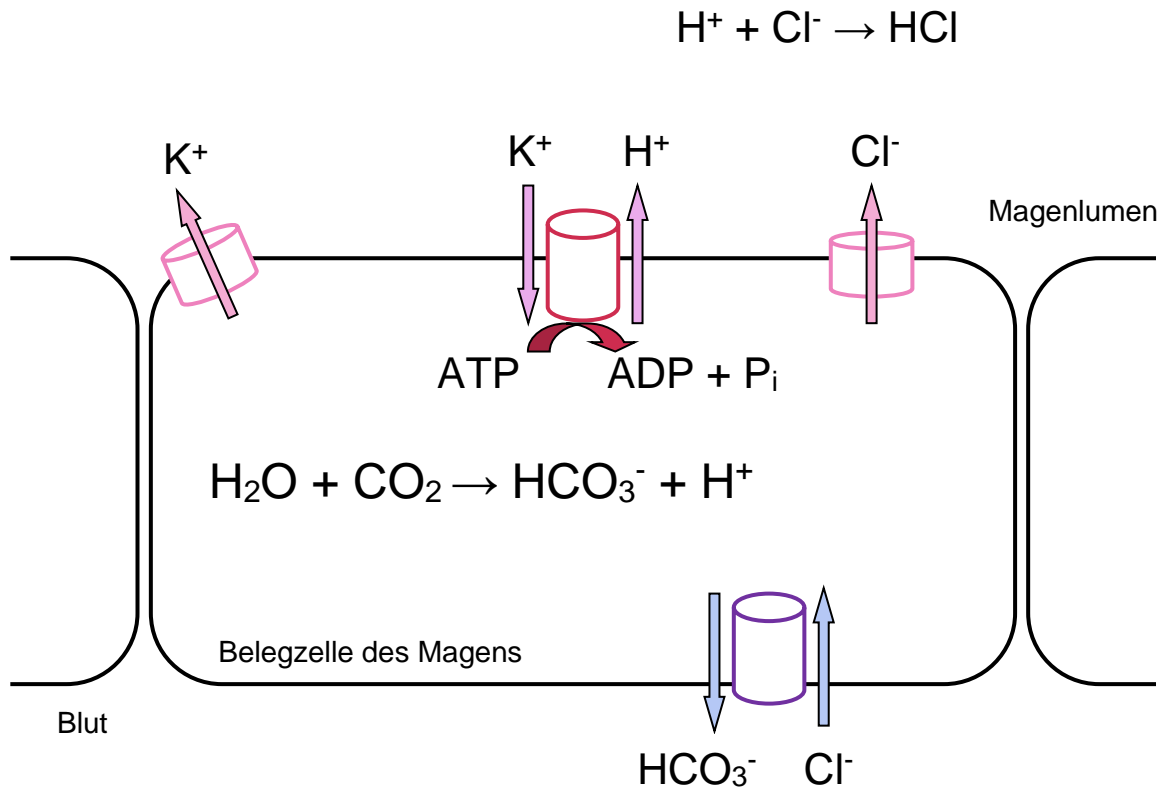


Abbildung 3 HCl-Sekretion der Belegzellen des Magens

1.5.4. Regulierung der HCl-Sekretion

Die HCl-Sekretion der Parietalzellen des Magens wird durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert beziehungsweise inhibiert. So greifen unter anderem neurale, hormonelle (vor allem Gastrin) und parakrine (z.B. Histamin, Somatostatin) Regulatoren dort an, aber auch beispielsweise durch die mechanische Dehnung der Magenschleimhaut in Folge von Nahrungsaufnahme kann die HCl-Sekretion gesteigert werden^[199].

1.5.5. Protonenpumpeninhibitoren

1.5.5.1. Wirkungsweise

Mit Entwicklung der Protonenpumpeninhibitoren ist es gelungen, medikamentös in die Bildung der Magensäure einzugreifen. Durch irreversible Bindung an die α -Untereinheit der H^+K^+ -ATPase wird die Sekretion von Protonen ins Magenlumen verhindert, wodurch weniger Salzsäure gebildet werden kann und der pH-Wert des Magens ansteigt^[102].

1.5.5.2. Indikation

Durch Beschreibung der Wirkungsweise von Protonenpumpeninhibitoren lassen sich schnell Rückschlüsse auf die Indikation der medikamentösen Therapie ziehen. So kommen PPIs unter anderem zum Schutz der Schleimhaut von Ösophagus, Magen und Duodenum bei GERD, Formen der Gastritis oder Ulcera ventriculi bzw. duodenalis sowie im Rahmen von Helicobacter pylori Eradikationschemata zum Einsatz^[115, 190].

1.5.5.3. Unerwünschte Nebenwirkungen

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass trotz der zuerst angenommenen wenigen, unbedeutenden unerwünschten Nebenwirkungen und der damit verbundenen großzügigen Verordnung der entsprechenden Medikamente, beispielsweise eine signifikante Erhöhung der Rate an gastrointestinalen Infektionen und Pneumonien bei Patienten unter einer PPI-Therapie beobachtet werden kann^[18, 36, 104, 109, 139].

Herzig et al. zeigen einen Zusammenhang von 0,9% der jährlichen nosokomialen Pneumonien in den USA mit einer Einnahme von PPIs^[104], welche somit die Todesursache von rund 33.000 Menschen jährlich darstellen könnte. Auch eine bis zu dreimal häufigere Rate an Gastroenteritiden mit Clostridium difficile^[122], Campylobacter species sowie Salmonellen wurde unter PPI-Medikation beschrieben^[144, 232]. Zuletzt wurde auch die positive Korrelation hinsichtlich des vermehrten Auftretens von Alzheimer Demenz unter Einnahme von PPI diskutiert, wobei dies nicht allein auf eine nachgewiesene Malabsorption von Vitamin B12^[134] zurückzuführen sei, sondern einem weitaus komplexeren Pathomechanismus unterliegen könnte. Erforscht wird hierbei eine erhöhte Bildung von Beta-Amyloiden in Folge der durch die Blut-Hirn-Schranke diffundierten Protonenpumpeninhibitoren^[90].

In einigen Reviews wurde unter prolongierter PPI-Therapie (> ein Jahr) auf ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Frakturen der Wirbelsäule (40–60%) sowie des Schenkelhalses (20–62%) hingewiesen, wobei hierbei keine geschlechtsspezifische Häufung gezeigt werden konnte^[71, 132, 136, 158]. Zuletzt sei noch auf eine weitere, sehr seltene, jedoch schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkung hingewiesen: Simpson et al. veröffentlichten Fallberichte über das Auftreten einer akuten interstitiellen Nephritis bei 15 Patienten in Folge der Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren^[206].

1.6. Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Dissertation und der vorangegangenen klinisch-experimentellen Studie war es, mit Hilfe standardisierter experimenteller Methoden, wie H.E.-Färbungen, immunhistochemischer Diagnostik sowie real-time qPCR, eine mögliche (Über-)Expression der H^+K^+ -ATPase in den Larynxbiopsien der an LPR leidenden Patienten nachzuweisen. Eine zuvor beschriebene, mangelnde Korrelation bezüglich des Auftretens von gastroösophagealen Refluxepisoden (GERD) sowie laryngopharyngealen Refluxbeschwerden und das schlechte Ansprechen der Symptome auf eine PPI-Einnahme stellt einen direkten Zusammenhang der beiden Erkrankungen in Frage und lässt alternative Hypothesen der Entstehung des laryngopharyngealen Refluxes Gegenstand aktueller Forschungsprojekte werden.

Des Weiteren wurden diese experimentellen Gewebeanalysen erstmals mit der Untersuchung oropharyngealer pH-Werte sowie der ösophagealen pH- und Impedanzmessung kombiniert und die Ergebnisse mit den Symptomen der Betroffenen verglichen, um somit eine mögliche Korrelation zwischen morphologischen Auffälligkeiten der Larynxmukosa sowie den jeweils gemessenen pH-Werten und der klinischen Präsentation nachzuweisen. Parallel hierzu wurde die Symptomverbesserung der einzelnen Patienten unter PPI-Therapie mit Hilfe klinischer Scores dokumentiert.

Die Klärung des Pathomechanismus, welcher zur Entstehung der laryngopharyngealen Beschwerden führt, könnte wichtige Informationen liefern, um endlich den Erkrankten eine effektive und standardisierte Therapieoption bieten zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und klinische Untersuchungen

Nachdem die klinisch-experimentelle Pilotstudie durch das Ethikkomitee der Technischen Universität München geprüft und akzeptiert wurde, konnten im Zeitraum zwischen Juni 2011 und Dezember 2012 zwanzig Patienten mit Symptomen einer atypischen Refluxerkrankung im Sinne eines laryngopharyngealen Refluxes in die Studie eingeschlossen werden (11 männliche, Alter 40–78 Jahre). Die Patienten wurden ausführlich über die geplante Studie und die anonyme Erhebung ihrer Daten informiert, woraufhin eine eventuell bestehende Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren für mindestens 14 Tage vor Einschluss in die Studie pausiert wurde.

2.1.1. Diagnose LPR

Zur Diagnostik des laryngopharyngealen Refluxes wurden in dieser Arbeit die beschriebenen klinischen Scores (Reflux Finding Score und Reflux Symptom Index)^[22, 23] angewandt. Der RFS wurde ab Werten von 11 oder mehr Punkten als pathologisch angesehen, während der RSI ab einem Wert von 21 Punkten oder darüber als auffällig gewertet wurde (siehe ausführliche Erklärung Kapitel 1.2.4.).

2.1.2. ÖGD

In der Ösophagogastroduodenoskopie wurde unter Sedierung mit Propofol (HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) gemäß aktueller deutscher Behandlungsregelungen^[187] bei den teilnehmenden Patienten eine manifeste erosive Refluxerkrankung, weitere makroskopisch sichtbare Komplikationen des gastroösophagealen Refluxes sowie ein malignes Geschehen ausgeschlossen. Zusätzlich wurden hierbei Biopsien (Radial Jaw® 4 Biopsy Forceps, Boston Scientific) für die späteren histologischen und molekularen Untersuchungen der Studie aus dem postkrikoidalen Bereich des Larynx entnommen.

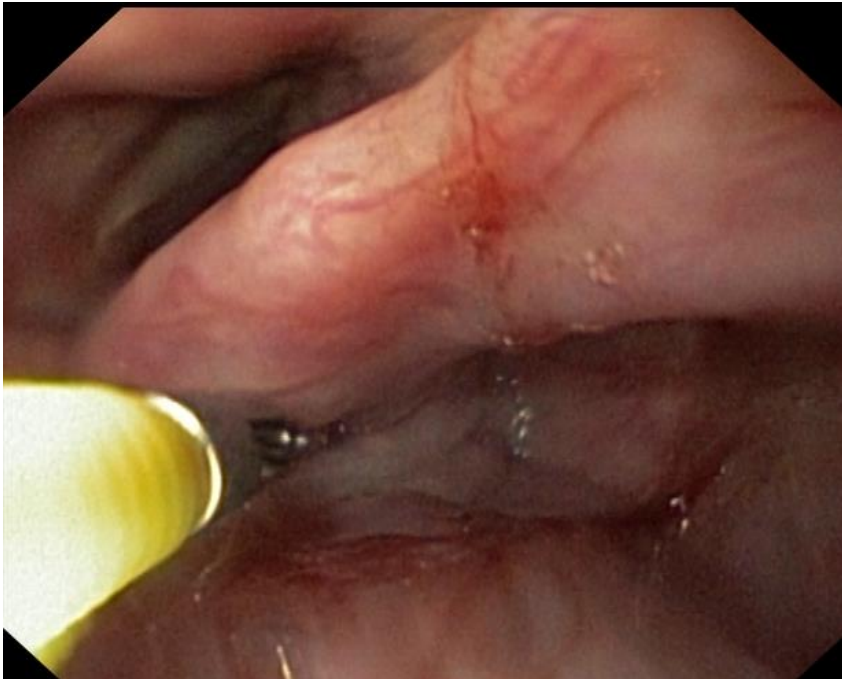


Abbildung 4 Endoskopie: postkrikoidaler Bereich des Larynx, Biopsieentnahme

2.1.3. Dx-pH Messung

Wie zuvor beschrieben, bietet die Dx-pH Messung eine sensitive, minimalinvasive und für den Patienten wenig unangenehme Methode zur Diagnostik pathologischer oropharyngealer pH-Werte.

In dieser Studie wurde die Messung der oropharyngealen pH-Werte für mindestens 22 Stunden im Abstand von 0,5 Sekunden (2 Hertz) gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Respiratory Technology Corporation (Restech), San Diego, Kalifornien, USA) ^[12, 13]. Zusätzlich wurden die Patienten gebeten, schriftlich die Uhrzeiten der eingenommenen Mahlzeiten festzuhalten und zu dokumentieren, wann sie sich in liegender bzw. in aufrechter Position befanden, um eine mögliche Korrelation mit den zu beobachtenden pH-Wert-Reduktionen zu bestimmen. Ausgewertet wurden die Untersuchungsergebnisse anschließend mit Hilfe einer entsprechenden Computersoftware.

2.1.4. pH- und Impedanz-Messung

Für die pH- und Impedanz-Messung wurden herkömmliche, multichannel intraluminale Systeme verwendet, welche 6 Elektroden zur Impedanzmessung kombiniert mit einer Sonde zur pH-Messung im Bereich des distalen Ösophagus beinhalten (Tecnomatix ZAN S 61 C 01 E, Sandhill Scientific, Highlands Ranch, Colorado, USA). Die pH-

Messsonde wurde 5 cm über dem zuvor durch Manometrie lokalisierten unteren Ösophagussphinkter platziert. Die Sonden der Impedanzmessung befanden sich somit ca. drei, fünf, sieben, neun, 15 und 17 Zentimeter oberhalb des unteren Ösophagussphinkters. Auch diese standardisierte Messung wurde bei den jeweiligen Patienten für mindestens 22 Stunden durchgeführt. In zuvor publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass diese im klinischen Alltag etablierte Methode eine hohe Sensitivität für sowohl sauren als auch nicht sauren Reflux bietet^[19, 203, 205].

2.1.5. Therapieversuch mit Protonenpumpeninhibitoren

Wie zuvor erwähnt, werden Patienten, welche unter (atypischen) Refluxbeschwerden leiden, nach aktuellem Standard der Leitlinien mit PPIs therapiert^[99]. Zur Diagnosestellung einer Refluxerkrankung kann somit unter anderem die erfolgreiche Therapie der Beschwerden mittels PPIs dienen, einer ‚Diagnosis ex juvantibus‘ entsprechend. Verschiedene Studien zeigten jedoch unterschiedlichste Ergebnisse bezüglich des Therapieerfolgs bei Patienten mit LPR: teilweise konnte keine eindeutige Besserung der Beschwerden unter Einnahme von PPIs im Vergleich zu Placebopräparaten gezeigt werden^[163, 230, 243], während andere Autoren über eine signifikante Wirksamkeit der Medikation berichten konnten^[69, 135, 182].

Behandelt wurden die Patienten in dieser Studie mit dem gängigsten Präparat der Protonenpumpeninhibitoren, Pantoprazol HEXAL® (Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) für mindestens drei Monate.

2.2. Histologische und molekulare Untersuchungen

2.2.1. Materialien

Tabelle 9 Technische Geräte, verwendete Gegenstände und Verbrauchsmaterialien

AxioCam HR	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Beheizte Paraffinausgießstation (EG1150H)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Deckgläser	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Gewebeeinbettkassetten	Medite GmbH, Burgdorf
Glasware	Schott Duran® Schott AG, Mainz
HERAsafe® Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Homogenisator SilentCrusher M	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom Microm HM355S	Thermo Scientific, Walldorf
Mikrotom-Klingen	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Mikrozentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Siemens, München
Minizentrifuge MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
Objektträger Superfrost® Plus	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Paraffin Streckbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
PCR-Röhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Reference®, Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen ‚safe seal‘ (steril)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Reaktionsröhrchen (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
StepOnePlus™ real-time PCR system	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen
Tissue Processor ASP200	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Vortex Genius 3	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
96-Well Magnetring Ständer	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA

Tabelle 10 Chemische Materialien

Antigen Unmasking Lösung, pH 9	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-Diaminobenzidin	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
dNTP-Mix (10 mM)	Applied Biosystem™, Warrington, United Kingdom
Eosin	Waldeck GmbH & Co KG, Münster
Ethanol, 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Goat Serum (G9023)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
MgCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pertex®	Medite GmbH, Burgdorf
QuantiFast® SYBR green PCR kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiFast® SYBR® green PCR master mix	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect Rev. Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Random Hexamers	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
RDD Puffer (DNA digest buffer)	Qiagen, Hilden
RLT Buffer (Lysis buffer)	Qiagen, Hilden
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden
RNasefreies Wasser	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Applied Biosystem™, Warrington, United Kingdom
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti® Histofix, 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Roti® Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RPE Wash Buffer	Qiagen, Hilden
RW1 Puffer	Qiagen, Hilden
TaqMan TR Buffer 10 x	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA

TE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vectastain® ABC Kit elite	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 11 Monoklonale Antikörper der humanen Protonenpumpe für IHC

H ⁺ K ⁺ -ATPase α-Untereinheit	1:285; D031-3, Clone 1H9, MBL®international corporation (Woburn, Massachusetts, USA)
H ⁺ K ⁺ -ATPase β-Untereinheit	1:285; D032-3, Clone 1B6 MBL®international corporation (Woburn, Massachusetts, USA)

Tabelle 12 Zweiter Antikörper der Immunhistochemie (biotyniliert)

Anti-Maus Immunglobulin Ziege (biotyniliert)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
---	--

Tabelle 13 Verwendete Primer der real-time qPCR (humane H⁺K⁺-ATPase)

H ⁺ K ⁺ -ATPase α-Untereinheit	Forward Primer (5'-3')	CTTTGCCATCCAGGCTAGTGA Tm 59°C
	Reverse Primer (3'-5')	GGTGACGACAACCACAGCAAT Tm 59°C
H ⁺ K ⁺ -ATPase β-Untereinheit	Forward Primer (5'-3')	CCAGGTGGGTGTGGATCAG Tm 58°C
	Reverse Primer (3'-5')	GAGGCACAGGGCGAAGAG Tm 58°C

Tabelle 14 Verwendete Primer der real-time qPCR (Cyclophilin A)

Cyclophilin A	Forward Primer (5'-3')	ATGGTCAACCCACCGTGT
	Reverse Primer (3'-5')	TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC

2.2.2. Untersuchungsprotokolle

2.2.2.1. Fixierung der Gewebebiopsien und Anfertigung von Paraffinblöcken

Nach der, von den Patienten in schriftlicher Form eingewilligten Entnahme der Biopsien im Rahmen einer ÖGD, wurden jene Proben, welche später für die real-time qPCR benötigt wurden, zunächst für 24 Stunden in RNA-Later Puffer bei 4°C im Kühlschrank gelagert und anschließend bei -20°C tiefgefroren. Jeweils eine weitere Biopsie pro Patient verblieb nach der Entnahme für 24 Stunden bei 4°C in 4% Formaldehydlösung und wurde anschließend in Gewebeeinbettkassetten in Ethanol gelagert, mit Hilfe des ASP200 Tissue Processor (Leica Biosystem) dehydriert, in Paraffin gebettet und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

2.2.2.2. Anfertigen der Paraffinschnitte

Mit Hilfe des Microtoms wurden aus den Paraffinblöcken zwei bis drei µm dicke Schnitte der Biopsien angefertigt und mittels Pinzette, Rasierklinge und Pinsel auf ein ca. 50°C warmes Wasserbad gelegt, um ein vollständiges Entfalten der Schnitte zu gewährleisten. Nach einigen Minuten wurden diese dann mit herkömmlichen Objektträgern aus dem Wasser gefischt und für einige Stunden zum Trocknen bei Raumtemperatur aufgestellt. Es wurden aus jeder Biopsie mehrere Schnittserien, bestehend aus jeweils zehn Schnitten im Abstand von 100 µm angefertigt, um hierdurch eine Untersuchung der gesamten Gewebeprobe zu ermöglichen.

2.2.2.3. H.E.-Färbung

Nach dem Trocknen der Schnitte wurden nach gängigen und standardisierten Protokollen Hämatoxylin-Eosin-Färbungen angefertigt, um die Morphologie und Histologie des Gewebes darzustellen. Hierfür wurden die Biopsieschnitte zunächst für 10 Minuten in Histo-Clear entparaffinisiert und anschließend in einer Ethanol-Reihe absteigend von 99%, 90% und 80% für jeweils sechs Minuten dehydriert, um hierdurch die Hydrophobie zu verringern. Nachdem die Schnitte dann eine Minute in destilliertem Wasser lagen, wurden sie für 25 Sekunden in Hämatoxylin getaucht und danach sofort unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Darstellung des Zytoplasmas und weiterer alkalischer Zellbestandteile wurden die Schnitte daraufhin für nur zwei Sekunden in das saure Eosin eingetaucht und anschließend drei Mal für jeweils 15

Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Um die Färbung zu fixieren wurde dann die Ethanol-Reihe erneut durchgeführt, dieses Mal jedoch aufsteigend, also zunächst in 80% EtOH, dann in 90% EtOH und zuletzt in 99% EtOH (jeweils 30 Sekunden). Abschließend lagen die Schnitte abermals für sechs Minuten in Histo-Clear bevor sie schließlich durch Pertex mit Deckgläsern luftdicht verschlossen wurden.

2.2.2.4. Immunhistochemie

In immunhistochemischen Untersuchungen lassen sich durch monoklonale Antikörper bestimmte Proteinoberflächenmerkmale von Zellen nachweisen. Die so genannten Primärantikörper binden hierbei an spezifische Epitope der Zelle und werden ihrerseits daraufhin durch zweite, biotynilierte Sekundärantikörper gebunden. In der mikroskopischen Untersuchung der einzelnen Gewebeschnitte lassen sich somit durch entsprechende braune Färbung indirekt Proteine der Zelloberfläche nachweisen.

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen die beiden Untereinheiten der humanen Protonenpumpe (H^+K^+ -ATPase) der Belegzellen des Magens verwendet. Als Positivkontrolle dienten folglich Gewebeproben aus der Kardiamukosa des Magens, dem physiologischen Expressionsort dieser Protonenpumpen. Um eine falsch-positive Färbung auszuschließen, wurden zudem Schnitte aus zuvor endoskopisch gewonnenen Biopsien einer Darmmukosa in die Versuchsreihe mit eingebunden, da hier physiologischerweise keine Expression der Protonenpumpen zu erwarten ist.

Durchführung

Wie auch zuvor im standardisierten Protokoll der H.E.-Färbung beschrieben, mussten die Gewebeschnitte vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung entparafinisiert und dehydriert werden: hierfür wurden sie zunächst zehn Minuten in Histo-Clear gelegt und anschließend für jeweils sechs Minuten in die absteigende Ethanolreihe von 99% EtOH, 90% EtOH und 80% EtOH getaucht. Zuletzt kamen die Schnitte für eine Minute in destilliertes Wasser, woraufhin sie zum Freilegen der Antigene für neun Minuten in einem Plastikschälchen mit 9,4% Antigen-Unmasking-Lösung in der Mikrowelle gekocht wurden und anschließend in der Lösung abkühlten. Nun wurden die einzelnen Schnitte mit Wasser gewaschen und daraufhin 10 Minuten mit je 100 μ l 3% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte jeweils zwei Mal mit Wasser und mit PBS gewaschen. Für je 10 Proben wurden dann 850 μ l PBS mit 50 μ l Goat Serum sowie 4 Tropfen Avidin gemischt und die Gewebeschnitte mit jeweils 100 μ l dieses Ansatzes für eine Stunde bei

RT inkubiert, um eine Fehlfärbung auf Grund von unspezifischen Bindungen durch die Antikörper zu verhindern. Gewaschen wurden die Schnitte anschließend mit PBS, um danach den primären Antikörper hinzuzugeben. Hierfür wurden jeweils 1-ml-Ansätze für 10 Schnitte gemischt, welche aus 850 µl PBS, 50 µl Goat Serum, 4 Tropfen Biotin sowie 4 µl des jeweiligen Antikörpers bestanden:

Tabelle 15 Monoklonale Antikörper der humanen Protonenpumpe

H ⁺ K ⁺ -ATPase α-Untereinheit	1:285; D031-3, Clone 1H9
H ⁺ K ⁺ -ATPase β-Untereinheit	1:285; D032-3, Clone 1B6

Mit jeweils 100 µl dieses Ansatzes wurden die Schnitte dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper durch wiederholtes Waschen mit PBS entfernt. Um die Bindungen des ersten Antikörpers anschließend sichtbar machen zu können, wurden die Gewebeschnitte mit einem zweiten, biotyniliertem Antikörper für eine Stunde inkubiert (ebenfalls 100µl pro Schnitt). Der Ansatz hierfür bestand aus 950 µl PBS, 50 µl Goat Serum sowie 2 µl des entsprechenden Antikörpers:

Tabelle 16 Zweiter Antikörper der Immunhistochemie (biotyniliert)

Anti-Mouse Immunglobulin Ziege (biotyniliert)	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
--	--

Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut mehrfach mit PBS gewaschen um daraufhin für 30 Minuten mit jeweils 100 µl ABC-Lösung bedeckt zu werden, wodurch eine Signalverstärkung erreicht werden sollte. Diese wurde zuvor aus 2,5 ml PBS sowie jeweils einem Tropfen Lösung A und B hergestellt und zunächst für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurden jeweils 100 µl eines kurz zuvor aus je einem Tropfen Puffer, DAB und 30%igem H₂O₂ sowie 2,5 ml Wasser gemischten Ansatzes zu den einzelnen Schnitten hinzugegeben und dort für fünf Minuten belassen. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zwei Mal mit Wasser gewaschen, um dann schließlich in Hämatoxylin gegengefärbt zu werden: die Schnitte wurden hierfür zweimal kurz in Hämatoxylin getaucht, anschließend wurde ungebundene Farblösung durch Spülen unter fließendem Leitungswasser wieder ausgewaschen. Nun wurden die Schnitte der Gewebeproben für jeweils 30 Sekunden in destilliertes Wasser sowie die aufsteigende Ethanolreihe (80%, 90% und 99% EtOH) getaucht. Zuletzt wurden die Objektträger mit

den Gewebeschnitten für zwei Mal drei Minuten in Histo-Clear gelegt um dann luftdicht mittels Pertex und Deckgläsern abgeschlossen zu werden.

Mikroskopisch konnten anschließend die Schnitte nach erfolgter H.E.-Färbung sowie immunhistochemischer Untersuchung ausgewertet werden, wobei die Frage nach dem Vorliegen von Drüsengewebe in den H.E.-gefärbten Schnitten sowie dem immunhistochemischen Nachweis von Protonenpumpen bei dieser Arbeit den Mittelpunkt der Untersuchungen darstellte. Mit Hilfe der AxioCam HR wurden die mikroskopischen Schnitte zusätzlich fotografisch dokumentiert und gespeichert.

2.2.2.5. Molekularbiologische Untersuchung

Die quantitative Bestimmung der Expression von Protonenpumpen in den einzelnen Larynxbiopsien der Patienten wurde mittels ‚real-time qPCR‘ durchgeführt, wobei die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA (reverse Transkription) und die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion in zwei getrennten Schritten, also in ‚two steps‘, abliefen:

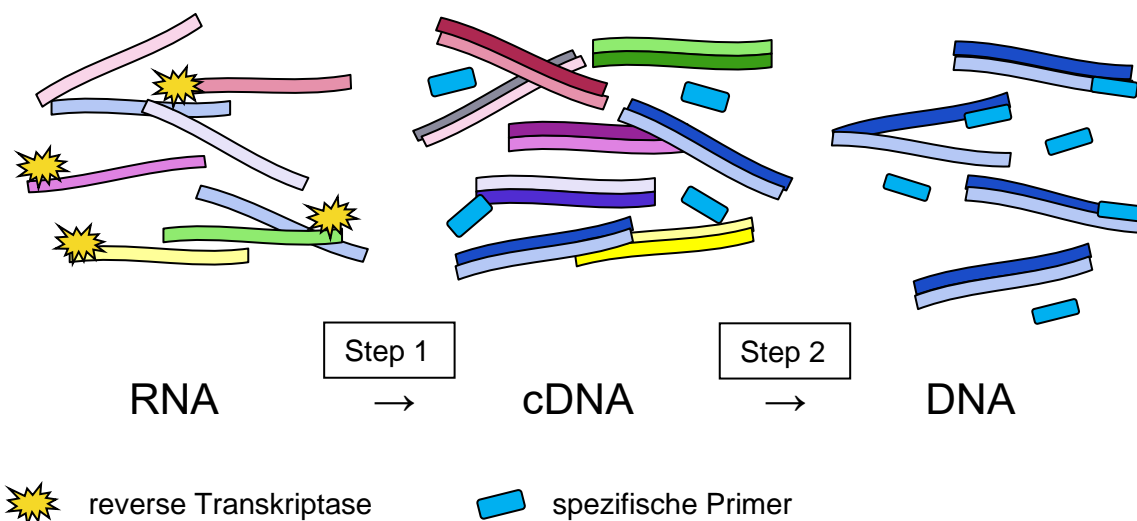


Abbildung 5 Prinzip der ‚two step‘ qPCR (von der RNA über cDNA zur DNA)

Nach Isolierung der RNA aus den Larynxgewebeproben und anschließender reverser Transkription zur komplementären DNA, konnte mit Hilfe der Verwendung spezifischer Primer (für die DNA-Abschnitte der H^+K^+ -ATPase) indirekt, durch Fluoreszenzmarkierung in der Polymerase-Kettenreaktion, eine Aussage bezüglich des Vorliegens dieser spezifischen RNA innerhalb der biopsierten Larynxzellen und somit auch der Expression der H^+K^+ -ATPase getätigt werden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine absolute,

sondern um eine relative Quantifizierung, bei der die Ergebnisse der Untersuchung mit der Expression eines Housekeeping Gens verglichen werden, um die initial unterschiedlichen RNA-Mengen innerhalb der einzelnen Patientenproben auszugleichen.

2.2.2.5.1. Nukleinsäure-Aufreinigung und Analytik

Homogenisierung

Um die Isolierung der Ribonukleinsäure vorzubereiten, wurden zunächst die in RNA-Later Puffer tiefgefrorenen Larynxbiopsien der Studienpatienten auf Eis aufgetaut und in einen Milliliter einer zuvor angesetzten Lösung aus RLT Puffer und 2-Mercaptoethanol 98% (Verhältnis 100:1) in ein herkömmliches 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gelegt. Hierdurch wurde die zelluläre Lyse einerseits unterstützt, andererseits musste eine irreversible Denaturierung der RNasen sichergestellt werden. Anschließend wurden die Gewebeproben mechanisch zerkleinert. Wurde nicht sofort daraufhin die RNA isoliert, wurden die Eppendorf-Gefäße mit dem Lysat bei -80°C tiefgefroren.

RNA-Extraktion

Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und die Isolation der RNA nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurden die Eppendorf-Gefäße mit den bereits homogenisierten Gewebeproben auf Eis gelegt bzw. aufgetaut. Um einen Flüssigkeitsverlust zu verhindern wurden alle Eppendorf-Gefäße vor dem Öffnen kurz zentrifugiert. Nun wurden 650 µl des Lysats in QiaShredder Spin Columns gegeben und diese, bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm), für zwei Minuten zentrifugiert. Zur abzentrifugierten Flüssigkeit im Collection Tube, in der sich nun die RNA befand, wurden 650 µl 70% Ethanol gegeben und die Medien gut gemischt. Hiervon wurden nun 650 µl entnommen und in das RNeasy Mini Column (2ml) pipettiert, welches dann für 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Da die RNA nun in der Membran aufgefangen wurde, konnte das Zentrifugat verworfen werden und der eben beschriebene Vorgang nochmals mit dem verbliebenen Lysat derselben Gewebeprobe wiederholt werden.

Anschließend wurden 350 µl des RW1 Puffers in das RNeasy Mini Column mit der isolierten RNA gegeben, woraufhin erneut für 30 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Auch nach diesem Vorgang konnte der Durchfluss entfernt werden. Schließlich wurden je 80 µl eines zuvor hergestellten Dnase-Inkubation-Mixes hinzu pipettiert und

für 15 Minuten bei RT in dem RNeasy Mini Column belassen. Dieser Mix bestand aus 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase 1-Stock Lösung pro Gewebeprobe.

Daraufhin wurde das RNeasy Mini Column, nach Zugabe von 350 µl RW1 Puffer, für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss abermals verworfen. Anschließend wurde erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, zuvor wurden jedoch 500 µl des RPE Puffers hinzugegeben. Nach Beseitigen des Durchflusses und Zugabe von weiteren 500 µl RPE Puffer wurde nochmals für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun wurde je ein RNeasy Column in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß hineingestellt und zum Eluieren der RNA je 30 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Dies wurde für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die isolierte RNA befand sich nun im Eppendorf-Gefäß, gelöst in RNase-freiem Wasser, und wurde sofort auf Eis gelagert.

Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Um eventuelle Verunreinigungen durch Salze festzustellen und diese dann gegebenenfalls mittels Fällung zu beseitigen, sowie die RNA-Konzentrationen in den einzelnen Proben für die spätere cDNA-Synthese zu bestimmen, wurde ein UV-Absorptionsspektrometer sowie das PC Programm Nano-Drop verwendet.

Nachdem 1,2 µl RNase-freies Wasser als Leerwert festgelegt wurden, konnten die einzelnen Ribonukleinsäure-Konzentrationen der Larynxbiopsien in 1 µl Probevolumen ermittelt werden (260nm, Lid Factor 50). Hintergrund dieser Messung ist die maximale Absorption von ultraviolettem Licht bei 257nm durch die RNA.

Ethanol-Präzipitation (= Fällung)^[201]

Zur Beseitigung eventuell zuvor nachgewiesener Verunreinigungen mit Salzen oder um die Konzentration der RNA (in ng/µl) zu erhöhen, wurde die zuvor in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöste RNA je mit 3 µl Natriumacetat und 60 µl Ethanol gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Zentrifugiert wurde am nächsten Tag mit maximaler Geschwindigkeit für 20 Minuten bei 4°C. Anschließend wurde das Zentrifugat verworfen und zu dem im Eppendorf-Gefäß verbliebenen Pellet 500 µl Ethanol hinzugefügt, woraufhin erneut für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und abermals das Zentrifugat vorsichtig ausgeleert wurde. Um nun das Pellet trocknen zu können, wurden die Eppendorf-Gefäße windgeschützt für 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Schließlich konnte die aufgereinigte RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C tiefgefroren werden.

2.2.2.5.2. cDNA-Synthese

Um später die real-time qPCR durchführen zu können, musste zunächst die zuvor isolierte RNA in die komplementäre DNA, die cDNA, transkribiert werden. Genutzt wurde hierbei das Prinzip des Enzyms „Reverse Transkriptase“^[39]. Die Durchführung erfolgte standardisiert (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben:

Die Eppendorf-Gefäße mit den jeweiligen RNA-Lösungen, sowie den benötigten Materialien zur Herstellung des Master Mixes (siehe Tabelle) wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 50 µl festgelegt, in welchem 1 µg RNA zu komplementärer DNA umgeschrieben werden sollte. Hierfür wurden je 30,75 µl Master Mix pro RNA-Probe hergestellt:

Tabelle 17 Herstellung Master Mix der cDNA-Synthese

5,0 µl	10 x TaqMan TR Buffer
12,5 µl	MgCl ₂
10,0 µl	dNTP-Mix
2,5 µl	Random Hexamers
1,0 µl	RNase Inhibitor
1,25 µl	MultiScribe™ Reverse Transkriptase

Hinzu gegeben wurde 1 µg der zuvor isolierten und gelösten RNA (Volumen je nach zuvor photometrisch bestimmter Konzentration) und anschließend, um das Reaktionsvolumen von 50 µl zu erreichen, mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Bei einigen sehr kleinen Biopsien konnte keine Gesamtmenge von 1 µg RNA isoliert werden, sodass die cDNA-Synthese in einem gerade für die geplante real-time qPCR ausreichenden Reaktionsvolumen von 35 µl mit einer geringeren Menge RNA stattfand. Von dem zuvor beschriebenen Master Mix wurden nun lediglich 21,5 µl pro RNA-Probe verwendet und anschließend, nach Hinzugeben der isolierten RNA, ebenfalls mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler gestellt, mittels standardisierter Programme (siehe Tabelle) erfolgte anschließend die cDNA-Synthese. Die neu synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Tabelle 18 Thermocycler Programm der cDNA-Synthese

1.	10 Minuten	25°C
2.	60 Minuten	48°C
3.	5 Minuten	95°C
4.	danach	4°C

2.2.2.5.3. Real-time qPCR

In diesem letzten Schritt wurde nun die cDNA der H⁺K⁺-ATPase mittels real-time qPCR quantifiziert, um somit auf die in den Larynxzellen der Patienten vorliegende Expression dieses Enzyms Rückschlüsse ziehen zu können. Das Prinzip der real-time qPCR besteht darin, mittels Fluoreszenzmarkern, welche in die neu synthetisierte dsDNA eingelagert werden, eine Quantifizierung der jeweiligen spezifischen DNA während der exponentiellen Phase der PCR zu ermöglichen.

In den hier durchgeführten Versuchsreihen wurde ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, SYBR Green I, verwendet^[252]. Die Durchführung der relativen Quantifizierung erfolgte in dieser Arbeit durch Verwendung des Housekeeping-Gens Cyclophilin A^[67, 221, 226].

Spezifische Primer

Um gezielt die cDNA der humanen Protonenpumpe (H⁺K⁺-ATPase) zu quantifizieren, wurden spezifische Primer nach gängigen Kriterien bestimmt und durch Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) synthetisiert:

Tabelle 19 Verwendete Primer der real-time qPCR (humane H⁺K⁺-ATPase)

H ⁺ -K ⁺ -ATPase α-Untereinheit	Forward Primer (5'-3')	CTTTGCCATCCAGGCTAGTGA Tm 59°C
	Reverse Primer (3'-5')	GGTGACGACAACCACAGCAAT Tm 59°C
H ⁺ -K ⁺ -ATPase β-Untereinheit	Forward Primer (5'-3')	CCAGGTGGGTGTGGATCAG Tm 58°C
	Reverse Primer (3'-5')	GAGGCACAGGGCGAAGAG Tm 58°C

Bevor die Primer in der real-time qPCR eingesetzt werden konnten, mussten sie in PCR-Wasser verdünnt werden, wobei eine Konzentration von ca. 100 pmol/μl angestrebt wurde.

Durchführung der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion

Für die Versuche dieser Arbeit wurde die SYBR-Green real-time qPCR mit 96 Well Platten verwendet. Es wurde hierfür ein Master Mix aus PCR-Wasser, den spezifischen Primern (jeweils Forward und Reverse der α - bzw. β -Untereinheit der H^+K^+ -ATPase) sowie dem SYBR-Green I Puffer nach Herstellerangaben angefertigt und 20 μ l hiervon in die jeweiligen Reaktionskammern der PCR-Platte pipettiert (lichtgeschützt).

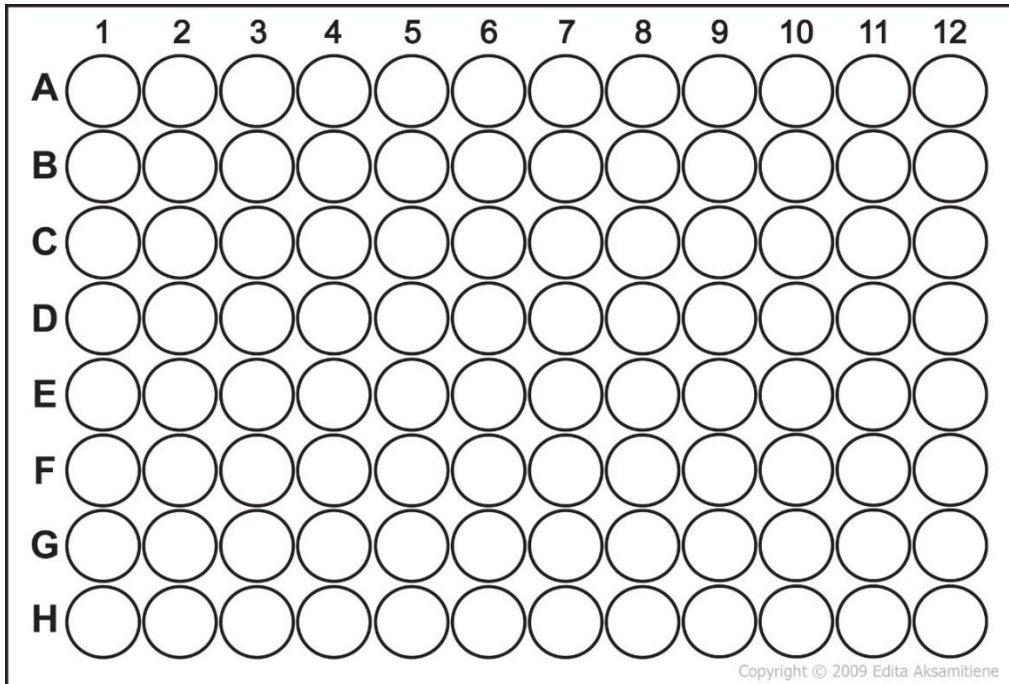


Abbildung 6 96 Well Platte der real-time qPCR^[2]

Im weiteren Vorgehen wurde aus der synthetisierten cDNA einer Biopsie des Magenkorpus (physiologischer Expressionsort der H^+K^+ -ATPase) eine Verdünnungsreihe in TE-Puffer angefertigt, um eine Standardkurve für die Protonenpumpen-Expression zu ermitteln. Hierbei war die genaue Molekülanzahl pro μ l jedoch nicht bekannt, sodass es sich um eine ‚relative Verdünnungsreihe‘ handelte.

Tabelle 20 Magenkorpusbiopsie Verdünnungsreihe

	Moleküle/ μ l	Moleküle/ 5 μ l
Sm ₁₀	1* 10 ⁵ x	5* 10 ⁵ x
Sm ₉	2* 10 ⁴ x	1* 10 ⁵ x
Sm ₈	1* 10 ⁴ x	5* 10 ⁴ x
Sm ₇	2* 10 ³ x	1* 10 ⁴ x

Sm ₆	1* 10 ³ x	5* 10 ³ x
Sm ₅	2* 10 ² x	1* 10 ³ x
Sm ₄	1* 10 ² x	5* 10 ² x
Sm ₃	2* 10x	1* 10 ² x
Sm ₂	10x	5* 10x
Sm ₁	2x	10x
Sm ₀	x	5x

Sm= Standardreihe Magen, x= unbekannte Menge an Molekülen

Um nun feststellen zu können, ob eine Expression der H⁺K⁺-ATPase in den Larynxzellen der Patienten vorhanden ist (und zusätzlich eine quantitative Bestimmung dieser zu ermöglichen), wurden jeweils 5 µl der oben beschriebenen Verdünnungsreihe der Magenkorpusbiopsie sowie der cDNA der einzelnen Patienten, einer Kolonbiopsie und TE-Puffer (beides Negativkontrollen) in die Wells der qPCR-Platte zu den oben beschriebenen 20 µl Master Mix pipettiert. Dieser Vorgang wurde im technischen Duplikat mit den Forward und Reverse Primern der α-UE der Protonenpumpe durchgeführt und anschließend in einem zweiten Versuchsansatz mit jenen Primern der β-UE.

Tabelle 21 Versuchsaufbau mit Standardkurve Magenkorpusbiopsie

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	P6	P6
B	P7	P7	P8	P8	P9	P9	P10	P10	P11	P11	P12	P12
C	P13	P13	P14	P14	P15	P15	P16	P16	P17	P17	P18	P18
D	P19	P19	P20	P20			PP	PP	PM	PM	PK	PK
E												
F	Sm ₀	Sm ₀	Sm ₁	Sm ₁	Sm ₂	Sm ₂	Sm ₃	Sm ₃	Sm ₄	Sm ₄	Sm ₅	Sm ₅
G	Sm ₆	Sm ₆	Sm ₇	Sm ₇	Sm ₈	Sm ₈	Sm ₉	Sm ₉	Sm ₁₀	Sm ₁₀		
H												

Legende: P1–20= Probe Patienten, PP= Probe TE-Puffer, PM= Probe Magen, PK= Probe Kolon, Sm= Standardkurve Magen

Anschließend wurde die PCR-Platte vorsichtig mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und bei 10.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Anhand der Software StepOne® wurde das standardisierte Vorgehen der real-time qPCR festgelegt und diese schließlich durch das real-time qPCR System (Applied Biosystems® StepOne™) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Tabelle 22 Ablauf der real-time qPCR

Zyklus 1 10 Minuten	95°C
Zyklus 2 (40 Wiederholungen) 15 Sekunden	95°C
60 Sekunden	60°C

Um später die Ergebnisse der einzelnen Patienten untereinander vergleichen zu können, musste zur relativen Quantifizierung die Standardkurve eines sogenannten House-keeping-Gens festgelegt werden. Hierbei handelt es sich um Gene, welche in nahezu jeder menschlichen Zelle exprimiert werden, wie beispielsweise GAPDH, β -Aktin oder auch Cyclophilin A, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Um die Standardkurve von Cyclophilin A zu erstellen, wurde die genau ermittelte Kopienzahl an Cyclophilin-cDNA in einem Eppendorf-Gefäß in den Verhältnissen 1:10 bzw. 1:5 mit TE-Puffer verdünnt, sodass schließlich folgende Verdünnungsreihe entstand:

Tabelle 23 Cyclophilin A Verdünnungsreihe

	Moleküle/ μ l	Moleküle/ 5 μ l
Sc ₈	1x 10 ⁹	5x 10 ⁹
Sc ₇	1x 10 ⁸	5x 10 ⁸
Sc ₆	1x 10 ⁷	5x 10 ⁷
Sc ₅	1x 10 ⁶	5x 10 ⁶
Sc ₄	1x 10 ⁵	5x 10 ⁵
Sc ₃	20.000	100.000
Sc ₂	4000	20.000
Sc ₁	800	4000
Sc ₀	160	800

Sc= Standardkurve Cyclophilin A

Nun wurden jeweils 5 μ l der einzelnen Verdünnungsstufen der cDNA von Cyclophilin A sowie 5 μ l der cDNA der Patienten, einer Magenkorpusbiopsie als Positivkontrolle, einer Kolonbiopsie sowie TE-Puffer als Negativkontrolle in die einzelnen Wells zu 20 μ l Master Mix pipettiert, welcher hier allerdings mit den spezifischen Forward und Reverse Primern für das Gen Cyclophilin A hergestellt wurde, und wie im Obigen beschrieben die qPCR gestartet.

Tabelle 24 Verwendete Primer der real-time qPCR (Cyclophilin A)

Forward Primer (5'-3')	ATGGTCAACCCCACCGTGT
Reverse Primer (3'-5')	TTCTGCTGTCTTTGGAAGTTTGTC

Tabelle 25 Versuchsaufbau mit Standardkurve Cyclophilin A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P2	P2	P3	P3	P4	P4	P5	P5	P6	P6
B	P7	P7	P8	P8	P9	P9	P10	P10	P11	P11	P12	P12
C	P13	P13	P14	P14	P15	P15	P16	P16	P17	P17	P18	P18
D	P19	P19	P20	P20			PP	PP	PM	PM	PK	PK
E												
F	Sc ₀	Sc ₀	Sc ₁	Sc ₁	Sc ₂	Sc ₂	Sc ₃	Sc ₃	Sc ₄	Sc ₄	Sc ₅	Sc ₅
G	Sc ₆	Sc ₆	Sc ₇	Sc ₇	Sc ₈	Sc ₈						
H												

P1–20= Probe Patienten, PP= Probe TE-Puffer, PM= Probe Magen, PK= Probe Kolon,
Sc= Standardkurve Cyclophilin A

Nur in der exponentiellen Phase der real-time qPCR, in welcher optimale Reaktionsbedingungen herrschen, wurde anhand der Fluoreszenzintensität der neu synthetisierten dsDNA die Expression der Protonenpumpen ermittelt. Von jenen Proben, bei welchen bis Zyklus 30 keine signifikante Quantifizierung messbar war, wurde eine in späteren Zyklen auftretende Fluoreszenz nicht mehr gewertet, da ab hier von einer zu hohen Fehlerquelle auszugehen ist. Mit Hilfe der parallel durchgeführten Kontrolle durch Schmelzkurvenanalyse wurden unspezifische Primer-Dimere ausgeschlossen.

Die Untersuchungen wurden wie oben beschrieben jeweils im Duplikat durchgeführt und nach Bildung der jeweiligen Mittelwerte erfolgte die relative Quantifizierung durch Vergleich mit dem Housekeeping Gen Cyclophilin A:

$$\frac{\text{Kopieanzahl Protonenpumpe}}{\text{Kopieanzahl Cyclophilin A}}$$

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Untersuchungen

20 Patienten, welche unter den Symptomen eines laryngopharyngealen Refluxes litten, wurden nach entsprechender Aufklärung sowie schriftlicher Einwilligung im Zeitraum von Juni 2011 bis Dezember 2012 in die Studie miteingeschlossen.

Die Diagnose ‚Laryngopharyngealer Reflux‘ wurde anhand der Anamnese sowie dem zuvor beschriebenen Reflux Finding Score und dem Reflux Symptom Index gestellt. Mittels Endoskopie wurden die Biopsien für den experimentellen Teil dieser Arbeit nach standardisierten Protokollen entnommen und Erkrankungen wie die GERD und deren Komplikationen wie ein Barrett Ösophagus oder Malignome im Bereich des oberen GI-Trakts ausgeschlossen. Die endoskopische Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit einem spezialisierten HNO-Arzt.

Alle klinischen Untersuchungen wurden von den Patienten gut toleriert und konnten ohne technische Komplikationen durchgeführt werden.

3.1.1. Dx-pH Messung

Am Computer konnte mit Hilfe einer speziellen Software die Dx-pH Messung der einzelnen Patienten ausgewertet werden. Als pathologisch wurde die Untersuchung gewertet, sobald der Ryan Score^[12] über 9,4 in aufrechter Position ($\text{pH} < 5,5$) beziehungsweise über 6,8 in liegender Position ($\text{pH} < 5,0$) betrug.

Der Ryan Score leitet sich hierbei vom klinisch etablierten DeMeester Score ab, in welchen folgende Parameter zur Diagnosestellung einer pathologischen pH-Messung eingehen: kumulative Dauer der pH-Wert Erniedrigungen in liegend und aufrecht verbrachter sowie insgesamt gemessener Zeit, die Anzahl der Episoden von pathologischen pH-Werten und jene dieser Episoden, welche über 5 Minuten anhalten, sowie die Dauer der am längsten bestehenden pH-Wert Reduktion^[57].

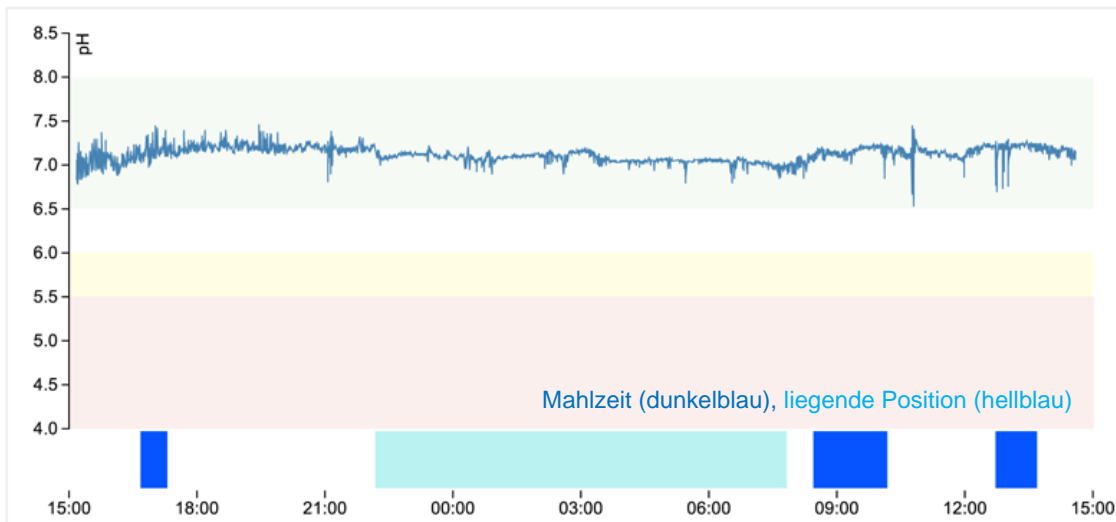


Abbildung 7 Oropharyngeale pH-Metrie mittels Dx-pH Messung, Normalbefund
 Beispielhaftes Bildmaterial der Respiratory Technology Corporation mit Modifikationen^[219]

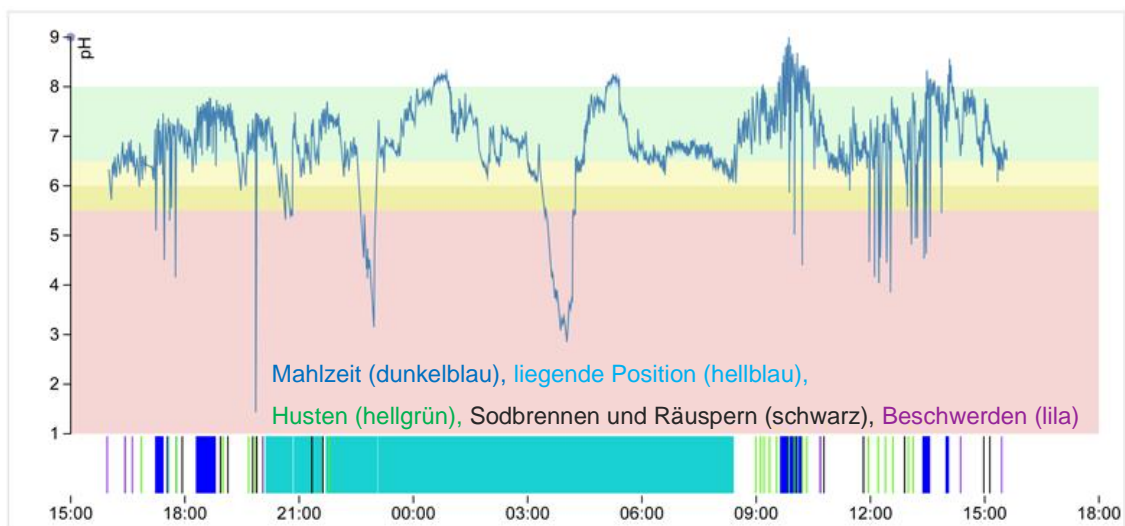


Abbildung 8 Oropharyngeale pH-Metrie mittels Dx-pH Messung, pathologischer Befund
 Beispielhaftes Bildmaterial der Respiratory Technology Corporation mit Modifikationen^[219]

In den hier durchgeführten oropharyngealen Dx-pH Messungen ergaben sich pathologische Untersuchungsbefunde bei 14 der 20 in die Studie eingeschlossenen Patienten, wobei nur vier davon auch in der ösophagealen pH- und Impedanzmessung auffällige Ergebnisse aufwiesen (einem gastroösophagealem Reflux entsprechend). Zehn der 14 Patienten (=71%) mit auffälliger Dx-pH Messung zeigten somit keinen korrelierenden gastroösophagealen Reflux, welcher die oropharyngealen pH-Wert Reduktionen direkt durch aufsteigende Magensäure erklären könnte.

Bei 92% der Patienten mit abnormer Dx-pH Messung wurde der Ryan Score in aufrechter Position pathologisch gewertet (13 der 14 Patienten), wohingegen er in liegender Position nur bei fünf der Genannten auffällig war (ein Patient wies einen erhöhten Ryan Score zwar in liegender, jedoch nicht in aufrechter Position auf). Die pathologischen Werte des Ryan Scores in aufrechter Position lagen hierbei verteilt zwischen 17,84 und 201,59 Punkten (pathologisch über 9,4), in liegender Position betragen sie 7,57 bis 11,31 Punkte (pathologisch über 6,8).

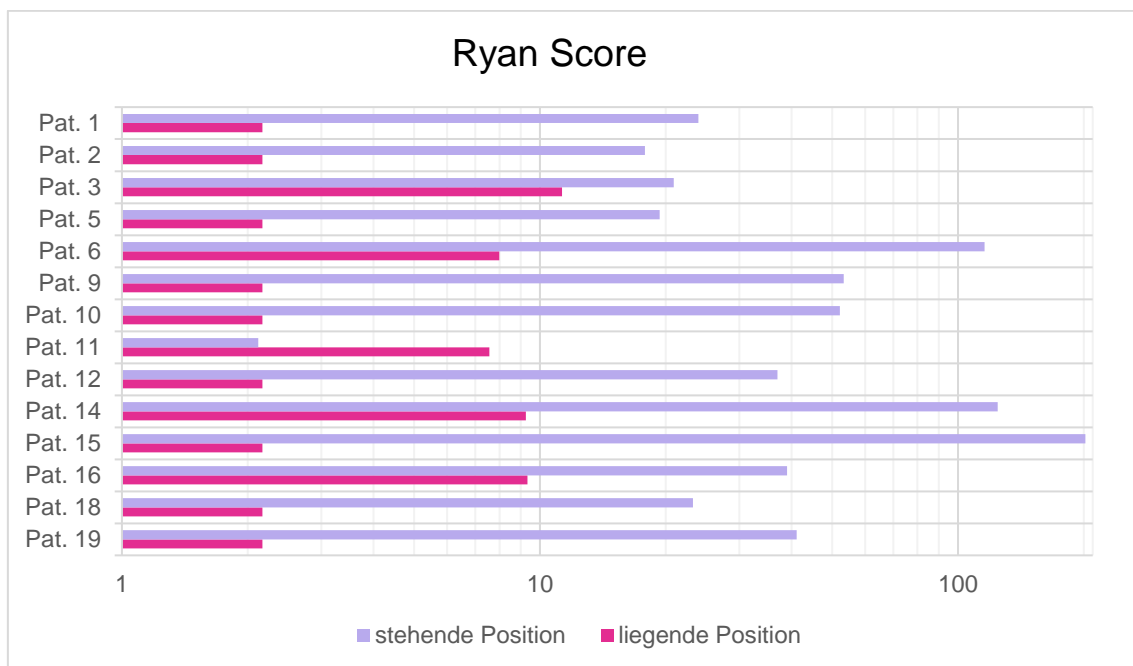


Abbildung 9 Verteilung der Werte des Ryan Scores in stehender und in liegender Position (logarithmische Achsenskalierung)

3.1.2. pH- und Impedanzmessung

Nach standardisierter Durchführung der intraluminalen Impedanz-Messung kombiniert mit der pH-Metrie des Ösophagus (zur Detektion von saurem/ nicht-saurem und flüssigem/ gasförmigem Reflux) wurden diese Ergebnisse ebenfalls am Computer ausgewertet und nach gängigen Maßstäben interpretiert. Die pH- und Impedanzmessung der Patienten wurde wie klinisch etabliert als pathologisch betrachtet, sobald der pH-Wert in über 4% der untersuchten Zeit bei unter 4 lag oder über 73 Episoden von solidem oder auch gemischt solidem und gasförmigem Reflux verteilt über den gesamten Zeitraum der Messung detektiert wurden^[203].

Sechs der 20 untersuchten Patienten wiesen hierbei pathologische Untersuchungsergebnisse auf, wobei vier davon ebenfalls in der Dx-pH Messung auffällige Werte zeigten (siehe 3.1.1).

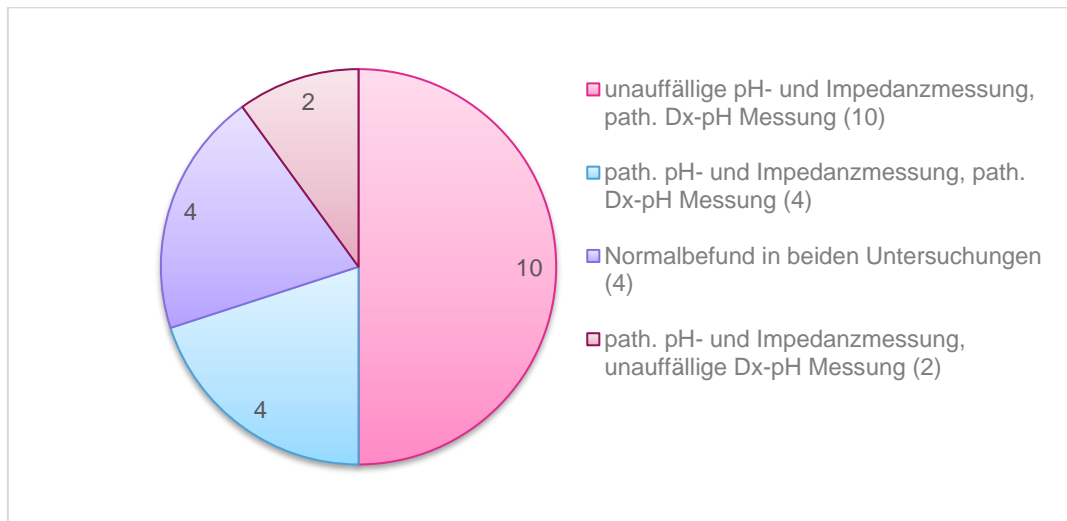


Abbildung 10 Vergleich oropharyngeale Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung

3.1.3. Therapieversuch mit Protonenpumpeninhibitoren

Eine daraufhin durchgeführte, standardisierte Therapie mit einem Protonenpumpeninhibitor (einmal täglich 40mg Pantoprazol®) führte bei 45% (9/20 Patienten) zu einer Symptomverbesserung, wobei diese auf einer 10-Punkte-Skala mindestens eine Reduktion der Beschwerden von drei Punkten umfassen sollte, um hier als Therapieerfolg gewertet zu werden. Ein Ansprechen der Beschwerden auf die PPI-Einnahme wurde bei vier der elf teilnehmenden Männer (36,4%) und fünf der neun teilnehmenden Frauen (55,5%) beobachtet:

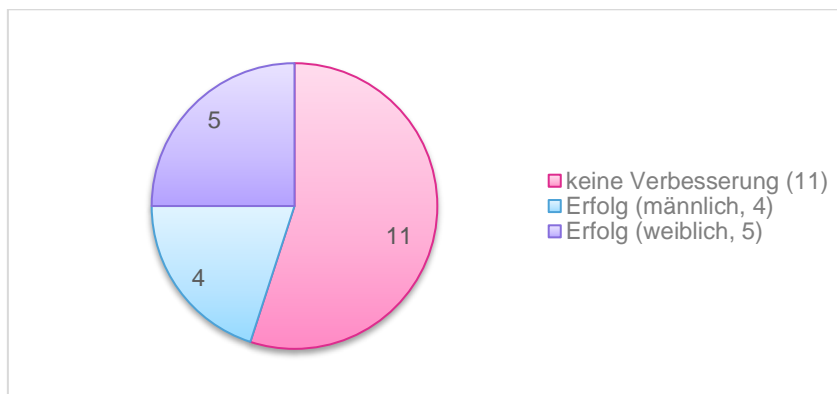


Abbildung 11 Anteil der Patienten mit Symptomverbesserung unter PPI-Therapie

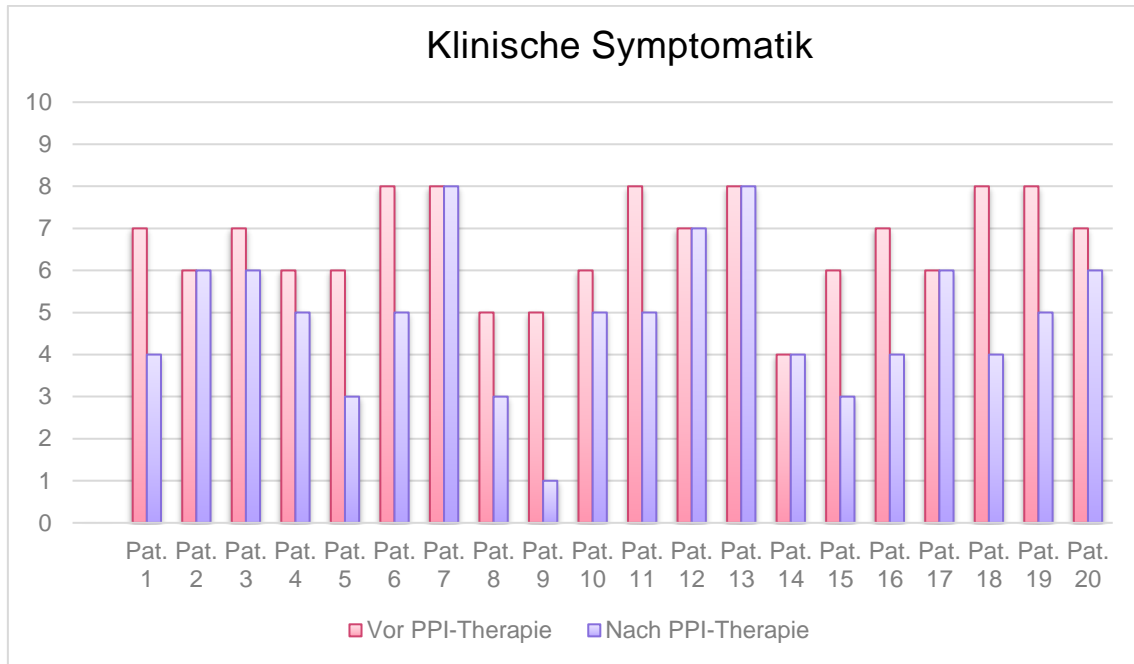


Abbildung 12 Skala der jeweiligen Symptomverbesserung unter PPI-Therapie

Auffallend war, dass alle neun Patienten, bei welchen die Therapie mit dem Protonenpumpeninhibitor zu einer Symptomlinderung verhalf, pathologische Werte in der Dx-pH Messung, im Sinne eines laryngealen pH-Wert Abfalls, aufwiesen.

Unter jenen Patienten mit pathologischen Ergebnissen in der Dx-pH Messung (14/20) lag die Erfolgsrate der PPI-Therapie somit bei 64,3% (9/14 Patienten). Dies ist im ein im Vergleich zu bisherigen Studien, welche den Therapieerfolg von PPIs bei Refluxbeschwerden untersuchten, sehr hoher Wert.

3.2. Histologische und molekulare Untersuchungen

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, ebenfalls nach gängigen, standardisierten Protokollen durchgeführt.

3.2.1. H.E.-Färbung und Immunhistochemie

Die Larynxgewebeschnitte der in dieser Studie untersuchten 20 Patienten wurden nach zuvor beschriebener Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie der immunhistochemischen Färbung (jeweils für die α - und β - Untereinheit der H^+K^+ -ATPase) unter dem Mikroskop ausgewertet. Hierbei wurde in der H.E.-Färbung der Biopsien nach Drüsenepithel gesucht sowie in der immunhistochemischen Untersuchung nach Markierung (Braunfärbung) durch biotynilierte Antikörper, welche ihrerseits an die monoklonalen Antikörper gegen die α - und β -Untereinheiten der H^+K^+ -ATPase binden (siehe Kapitel 1.5.).

Wir konnten bei einem Patienten in der H.E.-Färbung laryngeales Drüsenepithel nachweisen und zusätzlich auch eine immunhistochemisch darstellbare Expression der H^+K^+ -ATPase belegen.

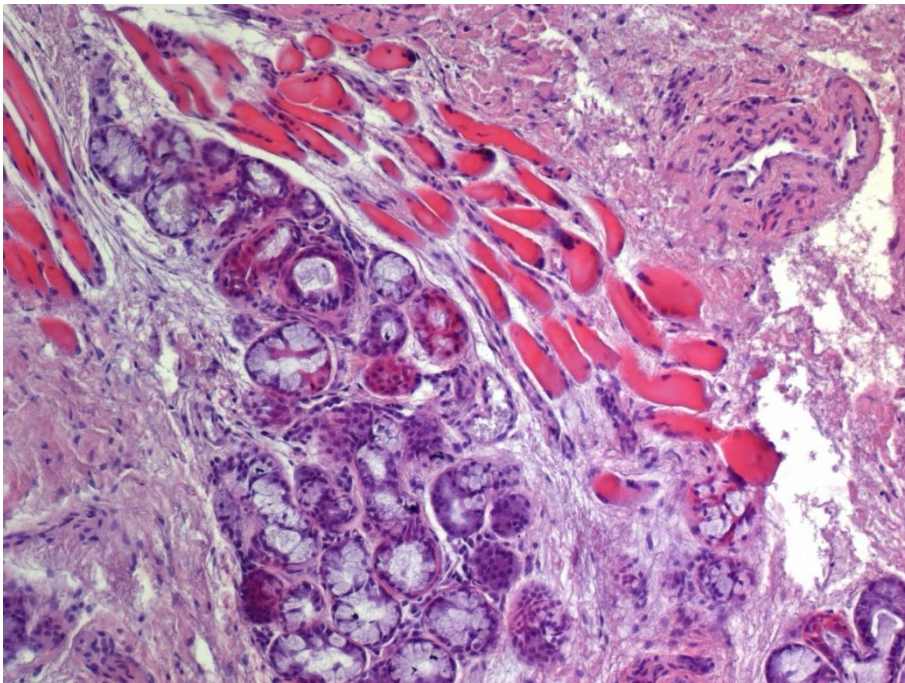


Abbildung 13 Drüsenepithel des Larynx von Patient Nr.6, HE-Färbung (I)

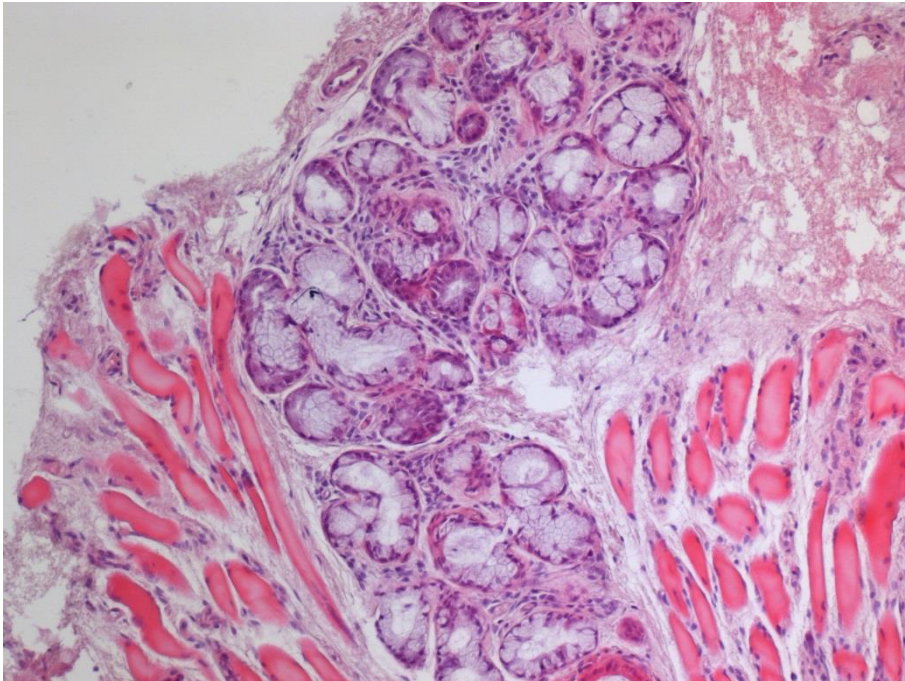


Abbildung 14 Drüsenepithel des Larynx von Patient Nr.6, HE-Färbung (II)

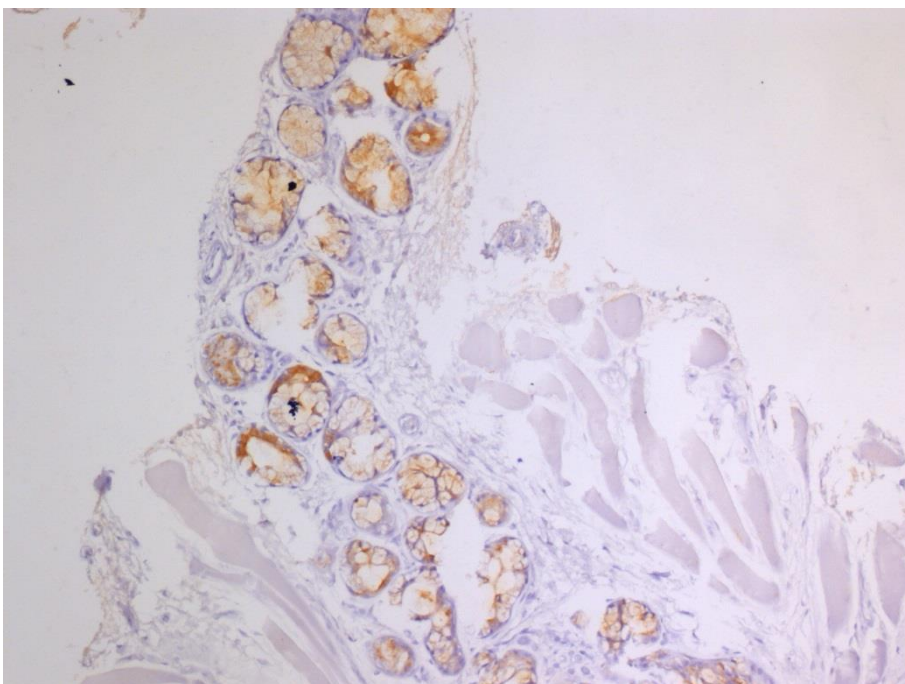


Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung des Larynx von Patient Nr.6, α -UE

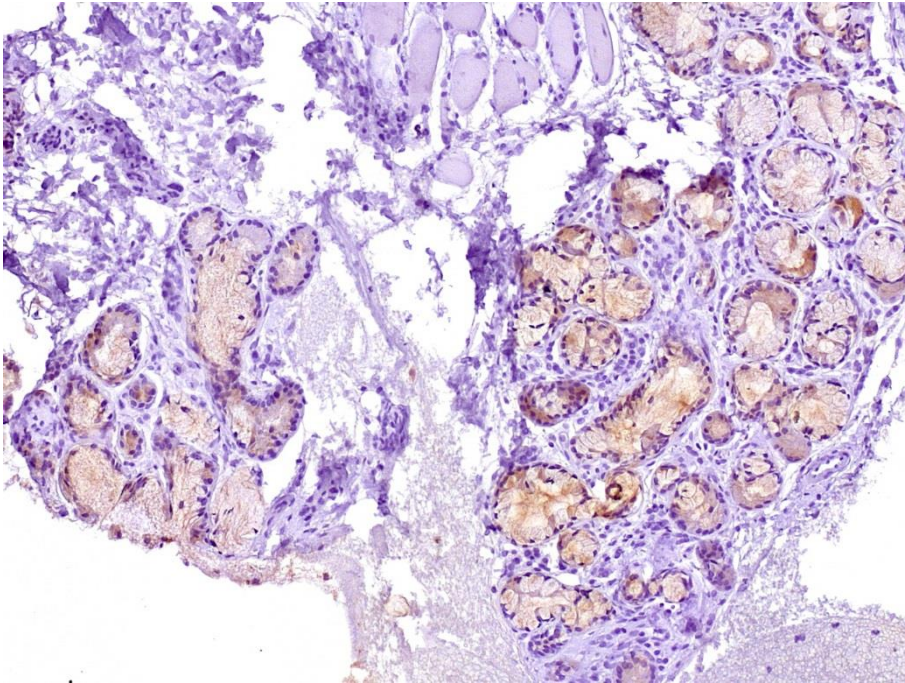


Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung des Larynx von Patient Nr.6, β -UE

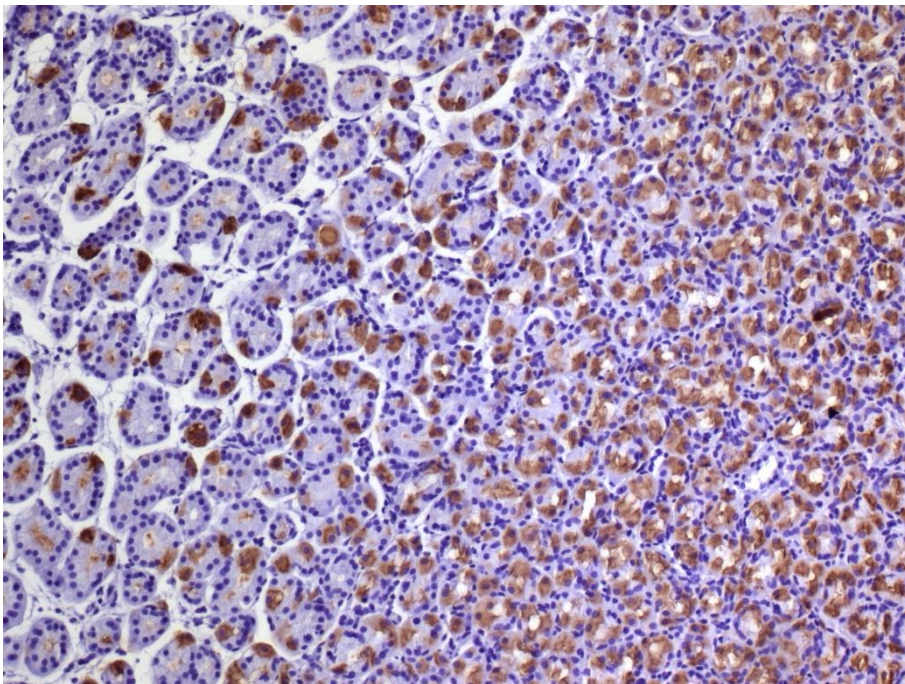


Abbildung 17 Magenmukosa Immunhistochemie α -UE (Positivkontrolle)

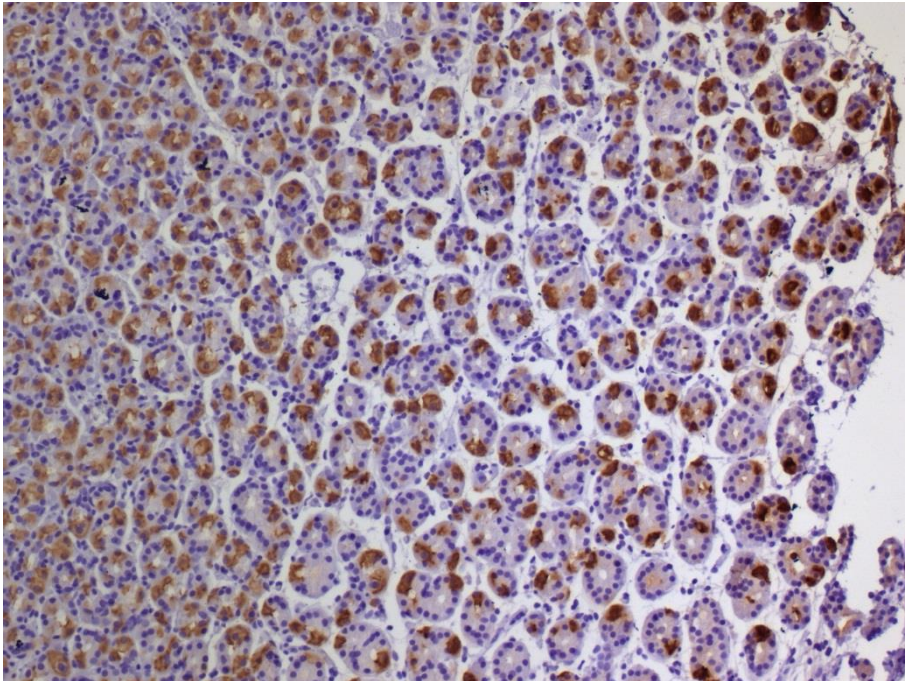


Abbildung 18 Magenmukosa Immunhistochemie β -UE (Positivkontrolle)

3.2.2. Real-time qPCR

Wie im Kapitel ‚Material und Methoden‘ beschrieben, wurde aus der isolierten RNA der Larynxbiopsien mittels reverser Transkription eine cDNA synthetisiert und anschließend in der SYBR Green I real-time qPCR die Expression des Enzyms H^+K^+ -ATPase untersucht (jeweils mit den Primern der α - und β -Untereinheiten der Protonenpumpe). Anschließend erfolgte zur relativen Quantifizierung der Vergleich mit der Expression des Housekeeping Gens Cyclophilin A innerhalb der jeweiligen Patientenprobe.

Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind in den folgenden Diagrammen zusammengefasst. Zeigt sich ein Wert der relativen Quantifizierung von größer/gleich eins, ist von einer signifikanten Expression der H^+K^+ -ATPase auszugehen. Mit Hilfe dieser Methode konnte erstmals in der Biopsie eines an LPR leidenden Patienten eine laryngeale Expression von Protonenpumpen nachgewiesen werden (Patient Nr. 11).

Bei Patient Nr. 6 hingegen (Drüsengewebe in der H.E.-Färbung, immunhistochemischer Nachweis der beiden Untereinheiten der H^+K^+ -ATPase) konnte in dieser Untersuchungsmethode jedoch kein Nachweis der laryngealen Protonenpumpen-Expression erfolgen.

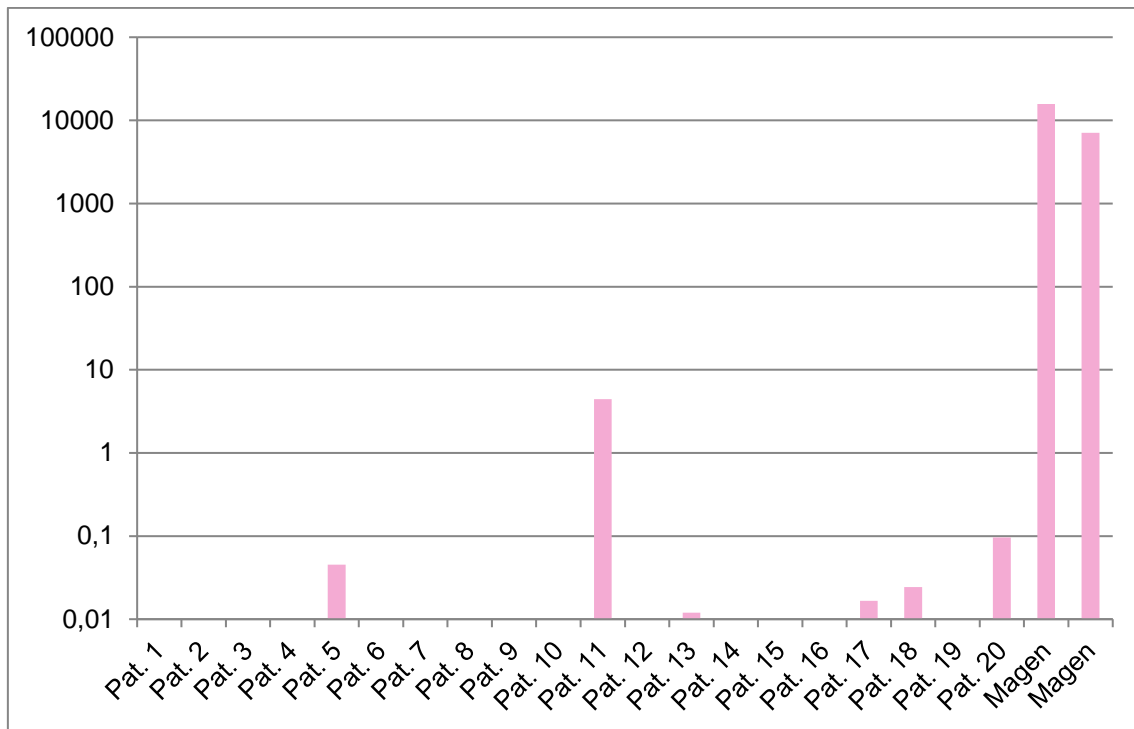


Abbildung 19 Relative Quantifizierung der α -Untereinheit mittels real-time qPCR (logarithmische Achsenskalierung)

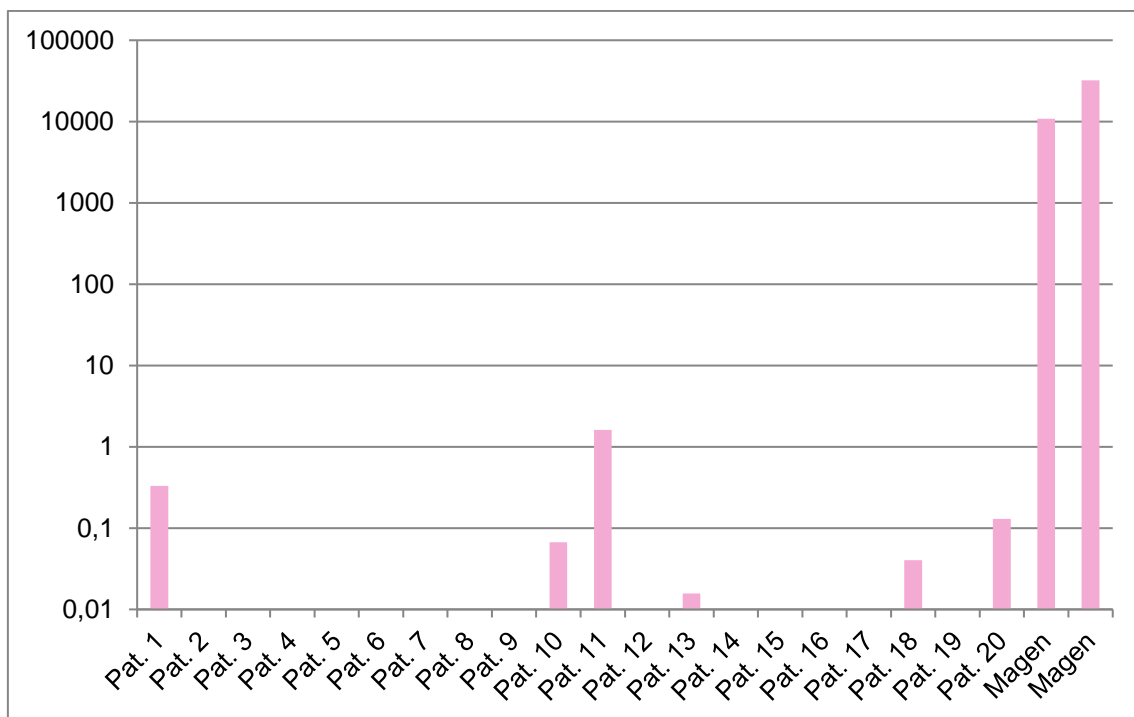


Abbildung 20 Relative Quantifizierung der β -Untereinheit mittels real-time qPCR (logarithmische Achsenskalierung)

3.3. Zusammenstellung der Ergebnisse

20 an den Symptomen des LPR leidende Patienten konnten mit Hilfe von Verwendung der empfohlenen klinischen Scores RFS und RSI in die klinisch-experimentelle Arbeit eingeschlossen werden, 11 männliche (55%) und neun weibliche. Das durchschnittliche Alter betrug 59,7 Jahre (medianes Alter: 58 Jahre).

Bei 14 der 20 untersuchten Patienten ließen sich pathologische pH-Werte in der oropharyngealen Dx-pH Messung nachweisen (71%), wobei innerhalb der männlichen Probanden 63,6% (7/11) pathologische Ergebnisse aufzeigten, bei den weiblichen Probanden sieben von neun (77,8%). Der Ryan Score dieser 14 Patienten lag hierbei in aufrechter Position zwischen 17,84 und 201,59 (pathologisch über 9,4), in liegender Position zwischen 7,57 und 11,31 (pathologisch über 6,8). Ein Patient hiervon wies lediglich einen erhöhten Ryan Score im Liegen auf, nicht jedoch in aufrechter Position.

In der standardisierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus ließen sich bei sechs der 20 Patienten (30%) pathologische Befunde nachweisen (männliche Patienten: 5/11 (45%), weibliche Patienten 1/9 (11%)), wobei vier dieser Patienten eine korrelierende Auffälligkeit der Werte in der Dx-pH Messung zeigten. Eventuell könnte dies einem nach proximal aufsteigenden gastroösophagealen Reflux entsprechen. Zehn der Patienten mit pathologischen Ergebnissen der oropharyngealen pH-Messung wiesen dementsprechend keinen (zeitlich) korrelierenden Zusammenhang mit ösophagealen Reflux-episoden auf.

Der Therapieversuch mit PPI verhalf neun der 20 Patienten zur signifikanten Symptomlinderung, wobei all jene auch pathologische Ergebnisse in der Dx-pH Methode aufwiesen. Somit lag unter den Patienten mit pathologischen Dx-pH Messungen (14/20) die Erfolgsrate der PPI-Therapie bei 64,3% (neun Patienten), ein im Vergleich zu bisherigen Studienergebnissen hoher Wert.

Es gelang bei einem Patienten (Nr. 6) der Nachweis von Drüsenepithel in der H.E.-Färbung sowie der H⁺K⁺-ATPase mittels immunohistochemischer Untersuchungen. Zusätzlich wies dieser Patient pathologische Werte in der Dx-pH Messung und in der kombinierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus auf. Ein Therapieversuch mit PPIs verhalf zur signifikanten Symptomverbesserung.

In der Biopsie eines weiteren Patienten (Nr. 11) konnte mittels real-time qPCR eine laryngeale Expression beider Untereinheiten der H⁺K⁺-ATPase nachgewiesen werden.

Dieser Patient zeigte zwar pathologische Ergebnisse in der Dx-pH Messung, jedoch unauffällige Befunde in der kombinierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus und wies ebenfalls eine Symptomverbesserung nach Therapie mit PPIs auf.

Tabelle 26 Auswertung der gesamten Untersuchungen

	Geschlecht	Alter (Jahre)	pH-Dx	Ryan Score > 9,4 aufrecht	Ryan Score > 6,8 liegend	Impedanzmessung	DeMeester Score < 22,0	Drüsenepithel	Immunhistologie	rt- qPCR	PPI-Therapie	Symptom-Score vor / nach PPI-Therapie
1	m	74	+	23,92	2,17	+	29,9	-	-	-	+	7/4
2	w	49	+	17,84	2,17	-	7,2	-	-	-	-	6/6
3	m	78	+	20,88	11,31	+	38,2	-	-	-	-	7/6
4	m	57	-	4,04	2,17	-	7,1	-	-	-	-	6/5
5	m	46	+	19,35	2,17	-	3,7	-	-	-	+	6/3
6	w	59	+	115,85	7,99	+	25,4	+	+	-	+	8/5
7	m	53	-	2,12	2,17	-	1,5	-	-	-	-	8/8
8	w	40	-	2,12	2,17	-	11,0	-	-	-	-	5/3
9	m	52	+	53,3	2,17	+	24,1	-	-	-	+	5/1
10	m	46	+	52,39	2,17	-	0,9	-	-	-	-	6/5
11	w	62	+	2,12	7,57	-	3,2	-	-	+	+	8/5
12	w	77	+	37,01	2,17	-	14,2	-	-	-	-	7/7
13	w	63	-	2,12	2,17	-	7,2	-	-	-	-	8/8
14	m	51	+	124,43	9,26	-	7,1	-	-	-	-	4/4
15	w	64	+	201,59	2,17	-	9,4	-	-	-	+	6/3
16	w	75	+	38,98	9,33	-	1,3	-	-	-	+	7/4
17	m	55	-	2,12	2,17	+	37,0	-	-	-	-	6/6
18	m	53	+	23,23	2,17	-	0,9	-	-	-	+	8/4
19	w	75	+	41,12	2,17	-	12,8	-	-	-	+	8/5
20	m	65	-	4,15	2,17	+	28,8	-	-	-	-	7/6

m männlich, w weiblich, - negativ, + positiv / pathologisch

Aus dieser Zusammenstellung der Ergebnisse ergibt sich bezüglich des Zusammenhangs eines messbaren gastroösophagealen Refluxes sowie pathologischer oropharyngealer Dx-pH Messungen folgende Tabelle:

Tabelle 27 Zusammenhang Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung

	ösophag. Messung pos.	ösophag. Messung neg.
Dx-pH Messung pos.	4/20 (a)	10/20 (d)
Dx-pH Messung neg.	2/20 (c)	4/20 (b)

Bei vier der 20 Patienten konnten sowohl ein gastroösophagealer Reflux in der pH- und Impedanzmessung als auch pathologische Werte in der oropharyngealen pH-Messung (Dx-pH Methode) nachgewiesen werden (a).

Weitere vier Patienten wiesen trotz klinischer Beschwerden keinerlei pathologische Untersuchungsergebnisse auf (b), während bei zwei Patienten ein gastroösophagealer Reflux ohne auffällige Ergebnisse in der Dx-pH Messung auffiel (c).

Bedeutend für die Hypothese der laryngealen Säureproduktion sind jene zehn Patienten, bei welchen eine unauffällige pH- und Impedanzmessung im Ösophagus durchgeführt wurde, jedoch auffällige Befunde in der oropharyngealen pH-Messung vorlagen (d).

4. Diskussion

Die verschiedenen Symptome des laryngopharyngealen Refluxes stellen für die an ihnen leidenden Patienten eine enorme Belastung und Einschränkung im Alltag dar^[51], so konnte beispielsweise unter anderem eine signifikante Assoziation zwischen dem Erkranken an einem LPR und dem Auftreten von Depressionen gezeigt werden^[117, 185]. Wenn weiterhin bedacht wird, wie beachtlich hoch die Anzahl jener ist, welche unter den beschriebenen Beschwerden leiden, wird die Dringlichkeit der Erforschung des Pathomechanismus dieser Erkrankung deutlich, um den Patienten endlich eine wirksame Therapieoption bieten zu können. Bisher konnte keine signifikante Besserung der Symptomatik unter standardisierter PPI-Einnahme im Vergleich zu Placebopräparaten festgestellt werden^[210]. Laut einer Studie von Koufman et al. leiden unter allen Patienten, welche sich in HNO-Praxen vorstellen, bis zu 10% unter Symptomen oder Befunden, welche durch einen laryngopharyngealen Reflux verursacht werden können^[130].

4.1. Bisherige Forschungsergebnisse

Wie bereits ausführlich in vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit dargestellt wurde, werden noch immer verschiedenste Mechanismen, welche die Symptome des LPR bedingen könnten diskutiert, beispielsweise das Vorliegen einer heterotrophen Magenschleimhaut im Ösophagus^[17, 45] oder die lokale Produktion von Säure durch eine oropharyngeale Besiedelung spezieller Bakterienstämme^[100]. Einige zuvor in experimentellen Forschungsprojekten erhobene Daten liefern wichtige Hinweise für den möglichen Pathomechanismus des LPR durch die laryngeale Expression von H⁺K⁺-ATPasen, Protonenpumpen, deren physiologischer Expressionsort die Korpus Schleimhaut des Magens ist, um dort lokal ein saures Milieu zur Verdauung von Speisebrei zu bilden (siehe Kapitel 1.2.3).

Zusätzlich weisen klinische Studienergebnisse von Yorulmaz et al.^[249], sowie Becker et al.^[21] darauf hin, dass das Auftreten eines Abfalls der oropharyngealen pH-Werte nicht mit einer distal im Ösophagus gemessenen Verminderung des pH-Werts (und somit einem direkten gastroösophagealen Reflux) korreliert: in der von Yorulmaz et al. veröffentlichten Arbeit konnte bei 52% der untersuchten 97 Patienten mit LPR in der Dx-pH Messung eine Verminderung der oropharyngealen pH-Werte gezeigt werden, während sich bei lediglich 32 Patienten (33%) ein Reflux im Bereich des distal liegenden Ösophagus zeigte.

Auch in der klinischen Studie von Becker et al.^[21] aus dem Jahre 2012 zeigte eine Kombination der ösophagealen pH- und Impedanzmessung sowie der oropharyngealen pH-Wert-Untersuchung (mit Hilfe der Dx-pH Methode, Restech™) nur eine geringe Korrelation zwischen laryngeal und weiter distal gemessenen Episoden von erniedrigten pH-Werten bzw. Refluxereignissen. Ein messbarer Abfall der pH-Werte im Larynx trat nur in 36,8% in zeitlichem Zusammenhang mit einer Refluxepisode des proximalen Ösophagus auf und lässt die Entstehung der laryngopharyngealen Beschwerden durch einen Reflux (saurer) gastraler Flüssigkeit somit fraglich erscheinen. Chiou et. al.^[44] beschrieben in ihrer klinischen Studie, welche 2011 veröffentlicht wurde, ebenfalls nur eine geringe Korrelation zwischen verminderten oropharyngeal gemessenen pH-Werten (ebenfalls mittels Dx-pH Messung) und simultanen bzw. zeitlich zusammenhängenden ösophagealen Refluxepisoden. Die geringe Verbesserung der Beschwerden des laryngopharyngealen Refluxes unter herkömmlicher, im Rahmen der Therapie einer GERD etablierten und von aktuellen Leitlinien empfohlenen Medikation mit Protonenpumpeninhibitoren, lässt zusätzlich an der Genese des LPR auf Grund von einem nach laryngopharyngeal aufsteigenden Reflux zweifeln^[210].

Bereits 1998 wurde eine Expression der H⁺K⁺-ATPase in menschlichem Larynxepithel nachgewiesen^[192], jedoch ohne eine entsprechende klinische Relevanz zu beobachten. Weitere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bekräftigten die Ergebnisse dieser laryngealen Enzymexpression^[6, 102], jedoch ebenfalls ohne eine parallele Erhebung klinischer Beschwerden durchzuführen oder einer vorherige Selektion der untersuchten Probanden bezüglich laryngopharyngealer Beschwerden.

In Zusammenschau der oben aufgeführten Studienergebnisse kann die Hypothese einer laryngealen Expression von Protonenpumpen (H⁺K⁺-ATPasen) aufgestellt werden, welche durch lokale Säureproduktion einen Abfall oropharyngealer pH-Werte bewirkt und somit zu den Symptomen des LPR führen könnte.

4.2. Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit

Ziel dieser Pilotstudie war es, wie bereits in zuvor von verschiedenen Arbeitsgruppen publizierten experimentellen Arbeiten, die Expression von H⁺K⁺-ATPasen in Larynxgewebeproben zu untersuchen, allerdings erstmals in den Biopsien solcher Patienten, welche die klinischen und diagnostischen Zeichen eines laryngopharyngealen Refluxes aufwiesen. Überdies hinaus konnten zum ersten Mal die experimentellen Befunde direkt mit den klinisch erhobenen Daten der oropharyngealen Dx-pH Messung und der

herkömmlichen, kombinierten ösophagealen pH- und Impedanzmessung der jeweiligen Patienten verglichen werden:

Für die Diagnosestellung des LPR (und somit die Selektion des zu untersuchenden Patientenkollektivs) hatten sich in vorherigen Forschungsprojekten sowie im klinischen Alltag einfache Methoden wie die Anwendung des RSI (klinische Symptomskala) und des RFS (laryngoskopische Befunde) als sinnvoll erwiesen^[22, 23]. Lechien et al. führen in einem kürzlich publizierten Review allerdings Mängel dieser Methoden durch das Missachten wichtiger laryngealer Veränderungen oder klinischer Beschwerden auf. Beispiele wie unter anderem schmerzhaftes Schlucken, Aufstoßen oder Stimmlippenerythem wurden hierbei genannt und eine mögliche Alternative zur Diagnosesicherung, der Reflux Symptom Score, vorgestellt^[138].

In dieser Arbeit wurde die Diagnostik durch die Dokumentation oropharyngealer pH-Werte, Verglichen mit herkömmlicher ösophagealer pH- und Impedanzmessung, sowie des Ryan Scores komplettiert. Es sei an dieser Stelle jedoch daraufhin gewiesen, dass das Diagnostizieren eines laryngopharyngealen Refluxes auf Grund der in Kapitel 1.4. aufgeführten Abweichungen innerhalb der gesunden Bevölkerung niemals nur auf das Vorliegen erniedrigter oropharyngealer pH-Werte gestützt sein sollte, sondern weitere klinische Parameter (RFS, RSI) miteinbezogen werden sollten. Zusätzliche Methoden zur Diagnosesicherung des LPR, wie beispielsweise die Untersuchung des Speichels der Betroffenen bezüglich des Gehalts an Pepsin oder Gallensäure, sind Gegenstand aktueller Forschungsprojekte und wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Neben einer Dokumentation der klinischen Beschwerden sowie des Therapieansprechens auf eine PPI-Einnahme der jeweiligen Patienten, erfolgten nach endoskopischer Gewebegewinnung die histopathologischen Untersuchungen wie in Kapitel 2 ausführlich aufgeführt.

Wie unsere Ergebnisse zeigen konnten, ist die Untersuchung der Hypothese einer laryngealen Expression von H⁺K⁺-ATPasen bei Patienten mit laryngopharyngealen Refluxbeschwerden durchaus begründet: wir konnten bei zwei Probanden unserer Studie (20 Patienten mit Symptomen des LPR im Alter von 40–78 Jahren) erstmals pathologisch verminderte oropharyngeale pH-Werte mittels Dx-pH Messung in Kombination mit der laryngealen Expression von H⁺K⁺-ATPasen nachweisen.

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen histopathologischen Diagnostik konnte das Vorliegen von Drüsenepithel sowie eine Expression der H⁺K⁺-ATPasen in der laryngealen

Gewebebiopsie eines Patienten dargestellt werden (H.E.-Färbung und Immunhistochemie). Zusätzlich wurden bei diesem Patienten pathologische Werte in der oropharyngealen Dx-pH Messung und in der kombinierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus dokumentiert. Ein Therapieversuch mit PPI verhalf diesem Patienten zur signifikanten Symptomlinderung.

In der Biopsie eines weiteren Patienten konnte mittels real-time qPCR eine laryngeale Expression beider Untereinheiten der H⁺K⁺-ATPase nachgewiesen werden (allerdings ohne auffällige Befunde in der H.E.-Färbung oder der immunhistochemischen Untersuchung) wobei dieser zwar pathologische Ergebnisse in der Dx-pH Messung, jedoch unauffällige Befunde in der kombinierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus aufwies. Eine Symptomverbesserung nach Therapie mit PPIs wurde hier beschrieben.

Sieben weiteren Patienten dieser Studie, sämtliche mit nachgewiesenen pathologischen laryngealen pH-Werten, verhalf die Einnahme von PPIs ebenfalls zur Linderung der laryngopharyngealen Beschwerdesymptomatik, während bei ihnen jedoch mit Hilfe der hier angewandten Methoden aktuell keine Expression der H⁺K⁺-ATPase in den Larynxgewebeproben nachgewiesen werden konnte.

Auch die bereits in Kapitel 3.3. aufgeführte Tabelle, welche die Korrelation pathologischer Untersuchungsergebnisse der ösophagealen pH- und Impedanzmessung sowie der oropharyngealen Dx-pH Messung aufzeigt, unterstützt die aufgestellte Hypothese der lokalen Säureproduktion:

Tabelle 28 Zusammenhang Dx-pH Messung und ösophageale pH- und Impedanzmessung

	ösophag. Messung pos.	ösophag. Messung neg.
Dx-pH Messung pos.	4/20	10/20
Dx-pH Messung neg.	2/20	4/20

Bei zehn der in dieser Arbeit untersuchten Patienten (50%) ließ sich mit Hilfe standardisierter Nachweisverfahren sowohl ein flüssiger oder aerosolierter als auch ein saurer oder nicht-saurer gastroösophagealer Reflux im Ösophagus ausschließen (in der kombinierten pH- und Impedanzmessung), wohingegen jedoch pathologische Untersuchungsergebnisse in der oropharyngealen Dx-pH Messung auffielen.

Von klinischem Interesse, insbesondere in Hinblick auf die erhebliche Anzahl der erkrankten Patienten, ist nun also die Fragestellung, ob mögliche laryngeal exprimierte H⁺K⁺-ATPasen durch eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren inhibiert werden und die Beschwerden der Betroffenen durch eine regelmäßige Einnahme dieser gelindert werden können. Bedingung hierfür ist insbesondere der strukturell identische Aufbau von möglichen im Larynx exprimierten Protonenpumpen und jenen, physiologischerweise in der Magenschleimhaut vorkommenden, um eine adäquate Bindung der inhibierenden Medikamente an die α -Untereinheit der H⁺K⁺-ATPase zu gewährleisten. Dies konnte durch Altman et al.^[4] bereits im Jahre 2003 sichergestellt werden: mittels immunhistochemischer Untersuchungen ließen sich durch Verwendung identischer monoklonaler Antikörper, Epitope der beiden Protonenpumpenuntereinheiten sowohl in den Biopsien einer Magenschleimhaut als auch im Larynxgewebe zweier Individuen nachweisen. Dies lässt vermuten, dass laryngopharyngeal exprimierte Protonenpumpen ebenfalls auf eine Therapie mit PPIs ansprechen würden und somit eine Symptomlinderung erzielt werden könnte.

Zwei Faktoren müssen hierbei jedoch bedacht werden:

Einerseits konnte in vorherigen Veröffentlichungen und auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der H⁺K⁺-ATPasen im Larynxgewebe in deutlich geringerem Ausmaße als in der Mukosa des Magens auftritt^[102]. Zum anderen besteht eine höhere Empfindlichkeit der Larynxmukosa gegenüber verminderter pH-Werte im Vergleich zur jener der Schleimhaut des Ösophagus. Dies wurde nicht nur in einzelnen Studien beschrieben^[128, 129, 173], sondern auch in einer von Merati et al.^[150] publizierten Metaanalyse aus dem Jahre 2005 bestätigt: so reichen bereits geringe Mengen saurer Flüssigkeit aus, um in der Larynxmukosa gravierende strukturelle Schäden zu verursachen, welche zu den beschriebenen laryngopharyngealen Symptomen führen können. Dies könnte der ausschlaggebende Faktor sein, weshalb bei den unter LPR leidenden Patienten zur Symptomlinderung prolongierte und intensiviertere Therapieschemata mit Protonenpumpeninhibitoren benötigt werden, wie in einer von Joshi et al. veröffentlichten Studie gezeigt werden konnte: eine Reduktion der entsprechenden Symptome konnte erst nach zweimonatiger PPI-Therapie beobachtet werden, wobei eine suffiziente Behandlung mittels PPI bei LPR für 6 Monate empfohlen wird^[118].

In unserer Arbeit konnten 64% (9/14) der Patienten mit pathologischen Ergebnissen der Dx-pH Messung von einer Symptomlinderung durch die Einnahme der Protonenpumpeninhibitoren berichten. Dies erscheint im Vergleich zu vorherigen Studien

bezüglich des Ansprechens von Refluxbeschwerden auf eine PPI-Therapie, bei welchen eine Rate von ca. 15% beschrieben wurde^[230], relativ hoch.

4.3. Limitationen dieser Arbeit

Die hohe Anzahl jener an Beschwerden des LPR Leidender dieser Studie, welche keinen nachweisbaren Reflux in der kombinierten pH- und Impedanzmessung des Ösophagus, jedoch einen Abfall oropharyngeal gemessener pH-Werte in der Dx-pH Methode zeigen, legt die Vermutung nahe, dass die tatsächliche Anzahl jener Patienten, bei welchen Protonenpumpen im Larynxgewebe exprimiert werden, deutlich höher sein könnte als in dieser Arbeit belegt werden konnte. Bekräftigt wird diese Annahme zusätzlich durch den Nachweis pathologischer Werte in der laryngealen Dx-pH Messung sämtlicher Patienten dieser Studie, welche unter Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren eine merkliche Besserung der jeweiligen laryngopharyngealen Beschwerden beschreiben. Auch war die Ansprechrate auf die durchgeführte PPI-Therapie unter jenen Patienten mit pathologischen Ergebnissen der laryngealen pH-Messung mit 64% (9/14 Patienten) relativ hoch einzustufen im Vergleich zur 2006 publizierten Studie von Vaezi et al., in welcher die Erfolgsrate der PPI-Medikation zur Symptomlinderung von LPR bei lediglich ca. 15% lag^[230].

Der fehlende Nachweis von H⁺K⁺-ATPasen mittels real-time qPCR und immunhistochemischer Untersuchungen in den hier untersuchten Larynxbiopsien könnte durch unterschiedliche Aspekte begründet sein: zum einen wurde in dieser Pilotstudie nur eine geringe Anzahl an LPR leidender Patienten eingeschlossen, wodurch möglicherweise auftretende Fehler in den klinischen und laborchemischen Untersuchungen an deutlich mehr Signifikanz gewinnen können als in größeren Patientenkollektiven. Des Weiteren sind potentiell exprimierte Protonenpumpen höchstwahrscheinlich in den seromukösen Drüsen der Larynxmukosa lokalisiert, was bedeutet, dass Gewebeproben dieser Drüsen untersucht werden müssen, um einen histopathologischen Nachweis der H⁺K⁺-ATPase zu erbringen. In der endoskopischen Darstellung des Larynx lassen sich diese jedoch makroskopisch nicht von umliegendem Larynxgewebe abgrenzen und können somit bei der Biopsieentnahme leicht verfehlt werden. In unserer Arbeit gelang ein histologischer Nachweis seromuköser Drüsen bedauerlicherweise nur im Larynxgewebe eines einzelnen Patienten, wobei in der immunhistochemischen Untersuchung genau dieses Patienten anschließend Protonenpumpen nachweisbar waren. Erschwerend kommt

hinzu, dass nur einzelne, sehr kleine Gewebeproben der jeweiligen Patienten entnommen werden konnten, was die Wahrscheinlichkeit, eventuell vorkommende pathologische Veränderungen zu verfehlen, deutlich erhöht. Wie in einer zuvor veröffentlichten Studie über die histologische Diagnostik der intestinalen Metaplasie durch die Arbeitsgruppe Gatenby et al. beispielsweise gezeigt werden konnte, steigt die Rate der erfolgreichen Diagnosesicherung in Abhängigkeit der entnommenen Biopsieanzahl sowie des maximalen Abstands der Proben im untersuchten Gewebe^[87].

Die geringe Größe des entnommenen Materials bedeutet zudem eine weitere Limitation im Nachweis der Protonenpumpen-Expression mittels molekularbiologischer Diagnostik (real-time qPCR). Wie in Kapitel 2 aufgezeigt wurde, betrug die hier vorliegenden Konzentrationen der isolierten RNA teils nur wenige ng/ml, was das Risiko des Auftretens von Stichprobenfehler weiter erhöht. Andererseits wurde die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von laryngeal exprimierten Protonenpumpen durch die Kombination der beiden laborchemischen Untersuchungen im Vergleich zur isoliert durchgeführten Immunhistochemie erhöht. So konnte bei einem Patienten, in dessen Larynxgewebe bedauerlicherweise der immunhistochemische Nachweis von Protonenpumpen nicht gelang, mittels molekularbiologischer Untersuchungen ein Vorliegen der H⁺K⁺-ATPase belegt werden. Auch eine möglicherweise erst durch lokale Inflammation, Reizung oder GERD auslösbare ‚Aktivierung‘, von im Zytoplasma bereits gespeicherten H⁺K⁺-ATPasen wurde diskutiert^[137, 192].

Mit ausschlaggebend für die Aufstellung der Hypothese einer lokalen, laryngealen Säureproduktion als möglicher Pathomechanismus des LPR war die fehlende Korrelation von reduzierten pH-Werten in den ösophagealen Untersuchungen und den oropharyngealen Dx-pH Messungen. Eine Entstehung der Symptome des LPR auf Grund von gastroösophagealen Refluxepisodes wurde daraufhin angezweifelt, insbesondere da nur ein geringes Therapieansprechen auf Protonenpumpeninhibitoren beobachtet werden konnte. Zuletzt wurden jedoch kritische Ansichten bezüglich der Aussagekraft der Dx-pH Messung geäußert, sodass diese aktuell kontrovers bewertet wird: neben der beschriebenen hohen Sensitivität ist von einer hohen Rate falsch-positiver Ergebnisse auszugehen^[150, 227]. Auch in dieser Arbeit waren die oropharyngealen pH-Wert Reduktionen teils nicht in der proximalen Sonde der herkömmlichen pH- und Impedanzmessung nachweisbar, andererseits wurden mittels Dx-pH Messung parallel proximal im Ösophagus gemessene saure pH-Werte ‚übersehen‘. So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei 70% der untersuchten Patienten pathologische Ergebnisse in der Dx-pH Messung, wohingegen nur 30% der Teilnehmer in der Standarddiagnostik

(pH- und Impedanzmessung) pathologische Werte aufwiesen. Zudem sei anzumerken, dass noch immer keine eindeutig gültige Verteilung innerhalb der gesunden Normalbevölkerung und eine entsprechende Angabe von Referenzwerten besteht. Nach wie vor stellt die kombinierte pH- und Impedanzmessung den Goldstandard der Diagnostik dar. Die Anwendung der Dx-pH Messung sollte sich zum aktuellen Zeitpunkt auf klinische Studien beschränken.

Zusammengefasst ist in zukünftigen Studien eine, wenn auch nur schwer umsetzbare, gezieltere Auswahl und wenn möglich größere Anzahl an laryngopharyngeal entnommenen Gewebebiopsien zur histologischen und molekularbiologischen Diagnostik dringend empfohlen. Hinsichtlich des Therapieeffekts durch PPIs sollte unter Erhalt der entsprechenden Therapiemaßnahmen eine Wiederholung der klinischen Diagnostik durchgeführt werden, um hierdurch den therapeutischen Effekt bezüglich der pathologischen pH-Werte zu dokumentieren und somit möglicherweise zusätzliche Hinweise auf die Genese der Beschwerden des LPR zu erlangen. Zudem sollte neben der hohen Sensitivität der Dx-pH Messung die entsprechende Rate falsch-positiver Ergebnisse beachtet werden und diese gegebenenfalls durch Optimierung der Methode reduziert werden.

4.4. Ausblick und mögliche nachfolgende Studien

Ausgehend von dieser Pilotstudie mit nur geringer Patientenzahl sollte in folgenden, multizentrisch durchgeführten, klinisch-experimentellen Studien in umfassenderen Patientenkollektiven der beschriebene mögliche Pathomechanismus der laryngopharyngealen Beschwerden weiter erforscht werden. Die Kombination der in dieser Arbeit erstmalig vereinbarten klinischen sowie experimentellen Untersuchungen sollte dabei unbedingt in zukünftigen Studien fortgeführt werden.

Zur Erhebung der klinischen Daten bei Patienten mit laryngopharyngealen Symptomen eignet sich neben den beiden beschriebenen Scores (RSI und RFS) die in dieser Arbeit vorgestellte und eingesetzte Methode mittels minimalinvasiver Dx-pH Messung, insbesondere auf Grund der guten Reproduzierbarkeit, einer hohen Sensitivität sowie der nur geringen Alltagseinschränkung für den untersuchten Patienten. Hierdurch kann die Compliance der Studienteilnahme deutlich erhöht werden (siehe Kapitel 1.4.)^[231]. Jedoch sollte auf Grund der befürchteten hohen Rate falsch-positiver Ergebnisse dieser

Untersuchung unbedingt weiterhin die Standardmethode der kombinierten ösophagealen pH- und Impedanzmessung miteinbezogen werden.

Bedacht werden sollte außerdem in nachfolgenden Studien bei der Gewinnung der Biopsien insbesondere die wahrscheinliche Lokalisation der exprimierten Protonenpumpen im Drüsengewebe der laryngealen Mukosa sowie die Optimierung der Diagnosesicherung durch Ausweitung des biopsierten Gewebeareals und der Anzahl entnommener Gewebeproben. Für die hier beschriebenen und empfohlenen laborchemischen Untersuchungen mittels Immunhistochemie und real-time qPCR sollten standardisierte Protokolle sowie Materialien verwendet werden, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Von besonderem Interesse für die betroffenen Patienten ist die engmaschige klinische Kontrolle des Ansprechens auf eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren, optimalerweise in Kombination mit wiederholt durchgeführten pH-Messungen. In einer einfach durchführbaren, randomisierten Doppelblindstudie könnte so die Reduktion oropharyngealer pH-Wertabfälle in Folge einer durchgeführten PPI-Therapie im direkten Vergleich mit einem Placebopräparat untersucht werden. Des Weiteren sollte dem multifaktoriellen Therapieansatz, welcher die Reduktion auslösender Faktoren, eine spezielle Ernährungsform, sowie den Einsatz von PPIs in Kombination mit Alginat und Magaldat beinhaltet, mehr Beachtung geschenkt werden.

Allerdings sollten auch weitere mögliche Pathomechanismen der Entstehung eines LPR Gegenstand von zukünftigen Forschungsprojekten sein. Die Möglichkeit einer multifaktoriellen Genese der Beschwerden kann nicht ausgeschlossen werden. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere die Hypothese des Vorliegens von heterotropher Magenschleimhaut im proximalen Ösophagus oder die laryngeale Besiedelung von säureproduzierenden Bakterien. Auch der Mechanismus einer ‚Aktivierung‘ zytologisch vorliegender Protonenpumpen in Folge von Inflammation oder Reizung des Larynxepithels durch ein saures Milieu, welcher bereits vor vielen Jahren in Veröffentlichungen diskutiert wurde, sollte die Fragestellung weiterer experimenteller Studien sein^[137, 192].

5. Zusammenfassung

Der Pathomechanismus des laryngopharyngealen Refluxes konnte bisher trotz zunehmenden Studienanzahlen noch immer nicht eindeutig geklärt werden. Hierdurch erweisen sich erhebliche Defizite in der Therapie der jeweiligen Beschwerden, was einerseits eine enorme Belastung der Betroffenen im Alltag bewirkt und andererseits eine erhöhte Korrelation mit anderen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Auftreten von Depressionen, herbeiführt. Insbesondere in Hinblick auf die steigende Anzahl der Betroffenen ist eine Klärung des Entstehungsmechanismus des LPR ein sehr wichtiger Gegenstand aktueller Forschungsprojekte^[3].

Verschiedene potentielle Ursachen dieser atypischen Form der Refluxerkrankung wurden bereits von Forschungsgruppen diskutiert. Unter anderem wurde die Hypothese einer Genese der Symptome durch die laryngeale Expression von H⁺K⁺-ATPasen aufgestellt. Diese sind Protonenpumpen, welche physiologischerweise in der Mukosa des Magens vorkommen, um dort durch die Sekretion von H⁺ und Cl⁻ ein saures lokales Milieu zu bilden, da hierdurch Chlorwasserstoff im Lumen des Magens entsteht. Untersuchungen, in welchen eine fehlende Korrelation hinsichtlich eines gastroösophagealen Refluxes (GERD) sowie oropharyngealer pH-Wert Reduktionen nachgewiesen wurden, unterstützen die Hypothese der laryngopharyngealen Säureproduktion.

Abgrenzend zu sämtlichen bisher durchgeführten Studien, wurde nun in dieser Arbeit erstmals die Kombination klinischer und histologischer sowie molekularbiologischer Untersuchungen bei symptomatischen Patienten umgesetzt:

Die Erhebung der klinischen Daten gelang mittels standardisierter Scores (RSI und RFS), oropharyngealer Dx-pH Messungen sowie herkömmlicher kombinierter pH- und Impedanzmessungen des Ösophagus. Larynxbiopsien der 20 in diese Studie eingeschlossenen Patienten (während einer Routine-ÖGD entnommen), konnten anschließend nach standardisierten Protokollen mittels H.E.-Färbungen, immunhistochemischer Untersuchungen sowie real-time qPCR hinsichtlich der Expression von H⁺K⁺-ATPasen analysiert werden.

Erstmals gelang es in den Larynxbiopsien zweier an LPR erkrankter Patienten, anhand der hier aufgeführten Diagnostik, eine Expression dieser Protonenpumpen nachzuweisen. Im Vergleich der klinischen Daten konnten pathologische Werte in den Dx-pH

Messungen der beiden aufgezeigt werden, wobei nur bei einem auch ein korrelierender gastroösophagealer Reflux in der ösophagealen pH- und Impedanzmessung beschrieben wurde. Durch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren konnte bei beiden Patienten eine Symptomlinderung erreicht werden (Reduktion auf der Symptomskala um mindestens drei Punkte). Im Allgemeinen wurde das Therapieansprechen auf PPIs unter den an LPR Erkrankten bisher kontrovers bewertet.

Bei den 18 weiteren Studienteilnehmern konnte mit Hilfe der hier beschriebenen Untersuchungen aktuell keine laryngeale Expression der H⁺K⁺-ATPase belegt werden. Die tatsächliche Anzahl der Patienten mit laryngealer Expression dieser Protonenpumpe bei LPR könnte aus den in Kapitel 4 genannten Gründen deutlich höher sein als hier aufgezeigt werden konnte. Es sollten daher weitere, multizentrische Studien mit größeren Patientenkollektiven folgen.

Auf Grund der anzunehmenden hohen Rate an falsch-positiven Dx-pH Messungen sollte die klinische Diagnostik mit Hilfe der standardisierten pH- und Impedanzmessung fortgeführt werden und die oropharyngeale Messung aktuell lediglich auf den ergänzenden Einsatz in klinischen Studien begrenzt werden. Die Rolle weiterer diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen, wie die Untersuchung der Pepsin-Konzentration im Speichel der Patienten, sowie dem Therapieansatz mit Alginate und Malgadrat, sollte nicht missachtet werden und Gegenstand weiterer Studien sein.

Nach aktueller Studienlage und Miteinbeziehen der hier aufgeführten Ergebnisse kann die Hypothese des möglichen Pathomechanismus des LPR durch eine laryngeale Expression der H⁺K⁺-ATPase nicht bestätigt werden. Die klinische Relevanz dieser Fragestellung scheint zum aktuellen Zeitpunkt eher gering einzuschätzen. Folgende klinische und experimentelle Studien sollten dringend auch weitere mögliche Pathomechanismen der Symptome des LPR untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Akbayir, N., Alkim, C., Erdem, L., Sokmen, H.M., Sungun, A., Basak, T., Turgut, S., Mungan, Z. Heterotopic gastric mucosa in the cervical esophagus (inlet patch): Endoscopic prevalence, histological and clinical characteristics. *Journal of gastroenterology and hepatology* (2004) 19:891-896.
2. Aksamitiene, E. 96 well plate. 2012. Webadresse: <http://www.cellsignet.com/media/templ.html>. Abgerufen am 05.04.2017.
3. Akst, L.M., Haque, O.J., Clarke, J.O., Hillel, A.T., Best, S.R., Altman, K.W. The changing impact of gastroesophageal reflux disease in clinical practice. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2017) 126:229-235.
4. Altman, K.W., Haines, G.K., 3rd, Hammer, N.D., Radosevich, J.A. The h+/k+-atpase (proton) pump is expressed in human laryngeal submucosal glands. *Laryngoscope* (2003) 113:1927-1930.
5. Altman, K.W., Kinoshita, Y., Tan, M., Burstein, D., Radosevich, J.A. Western blot confirmation of the h+/k+-atpase proton pump in the human larynx and submandibular gland. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2011) 145:783-788.
6. Altman, K.W., Waltonen, J.D., Hammer, N.D., Radosevich, J.A., Haines, G.K., 3rd Proton pump (h+/k+-atpase) expression in human laryngeal seromucinous glands. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2005) 133:718-724.
7. Amadi, C., Gatenby, P. Barrett's oesophagus: Current controversies. *World J Gastroenterol* (2017) 23:5051-5067.
8. Amin, S.M., Abdel Maged, K.H., Naser, A.Y., Aly, B.H. Laryngopharyngeal reflux with sore throat: An ultrastructural study of oropharyngeal epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2009) 118:362-367.
9. Armstrong, D. Endoscopic evaluation of gastro-esophageal reflux disease. *Yale J Biol Med* (1999) 72:93-100.
10. Armstrong, D., Bennett, J.R., Blum, A.L., Dent, J., De Dombal, F.T., Galniche, J.P., Lundell, L., Margulies, M., Richter, J.E., Spechler, S.J., Tytgat, G.N., Wallin, L. The endoscopic assessment of esophagitis: A progress report on observer agreement. *Gastroenterology* (1996) 111:85-92.
11. Axford, S.E., Sharp, N., Ross, P.E., Pearson, J.P., Dettmar, P.W., Panetti, M., Koufman, J.A. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: Preliminary studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2001) 110:1099-1108.
12. Ayazi, S., Hagen, J.A., Zehetner, J., Oezcelik, A., Abate, E., Kohn, G.P., Sohn, H.J., Lipham, J.C., Demeester, S.R., Demeester, T.R. Proximal esophageal ph monitoring: Improved definition of normal values and determination of a composite ph score. *J Am Coll Surg* (2010) 210:345-350.
13. Ayazi, S., Lipham, J.C., Hagen, J.A., Tang, A.L., Zehetner, J., Leers, J.M., Oezcelik, A., Abate, E., Banki, F., DeMeester, S.R., DeMeester, T.R. A new technique for measurement of pharyngeal ph: Normal values and discriminating ph threshold. *J Gastrointest Surg* (2009) 13:1422-1429.
14. Bajbouj, M., Becker, V., Neuber, M., Schmid, R.M., Meining, A. Combined ph-metry/impedance monitoring increases the diagnostic yield in patients

- with atypical gastroesophageal reflux symptoms. *Digestion* (2007) 76:223-228.
15. Bamberg, K., Mercier, F., Reuben, M.A., Kobayashi, Y., Munson, K.B., Sachs, G. Cdna cloning and membrane topology of the rabbit gastric h+/k(+)-atpase alpha-subunit. *Biochim Biophys Acta* (1992) 7:69-77.
 16. Barona-Lleo, L., Barona-De Guzman, R., Krstulovic, C. The diagnostic usefulness of the salivary pepsin test in symptomatic laryngopharyngeal reflux. *J Voice* (2018).
 17. Basseri, B., Conklin, J.L., Mertens, R.B., Lo, S.K., Bellack, G.S., Shaye, O.A. Heterotopic gastric mucosa (inlet patch) in a patient with laryngopharyngeal reflux (lpr) and laryngeal carcinoma: A case report and review of literature. *Dis Esophagus* (2009) 22:E1-5.
 18. Bavishi, C., Dupont, H.L. Systematic review: The use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Aliment Pharmacol Ther* (2011) 34:1269-1281.
 19. Becker, V., Bajbouj, M., Waller, K., Schmid, R.M., Meining, A. Clinical trial: Persistent gastro-oesophageal reflux symptoms despite standard therapy with proton pump inhibitors - a follow-up study of intraluminal-impedance guided therapy. *Aliment Pharmacol Ther* (2007) 26:1355-1360.
 20. Becker, V., Drabner, R., Graf, S., Schlag, C., Nennstiel, S., Buchberger, A.M., Schmid, R.M., Saur, D., Bajbouj, M. New aspects in the pathomechanism and diagnosis of the laryngopharyngeal reflux-clinical impact of laryngeal proton pumps and pharyngeal ph metry in extraesophageal gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol* (2015) 21:982-987.
 21. Becker, V., Graf, S., Schlag, C., Schuster, T., Feussner, H., Schmid, R.M., Bajbouj, M. First agreement analysis and day-to-day comparison of pharyngeal ph monitoring with ph/impedance monitoring in patients with suspected laryngopharyngeal reflux. *J Gastrointest Surg* (2012) 16:1096-1101.
 22. Belafsky, P.C., Postma, G.N., Koufman, J.A. Laryngopharyngeal reflux symptoms improve before changes in physical findings. *Laryngoscope* (2001) 111:979-981.
 23. Belafsky, P.C., Postma, G.N., Koufman, J.A. The validity and reliability of the reflux finding score (rfs). *Laryngoscope* (2001) 111:1313-1317.
 24. Birchall, M.A., Bailey, M., Gutowska-Owsiak, D., Johnston, N., Inman, C.F., Stokes, C.R., Postma, G., Pazmany, L., Koufman, J.A., Phillips, A., Rees, L.E. Immunologic response of the laryngeal mucosa to extraesophageal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2008) 117:891-895.
 25. Boekema, P.J., Samsom, M., Smout, A.J. Effect of coffee on gastro-oesophageal reflux in patients with reflux disease and healthy controls. *Eur J Gastroenterol Hepatol* (1999) 11:1271-1276.
 26. Book, D.T., Rhee, J.S., Toohill, R.J., Smith, T.L. Perspectives in laryngopharyngeal reflux: An international survey. *Laryngoscope* (2002) 112:1399-1406.
 27. Borhan-Manesh, F., Farnum, J.B. Incidence of heterotopic gastric mucosa in the upper oesophagus. *Gut* (1991) 32:968-972.

28. Branski, R.C., Bhattacharyya, N., Shapiro, J. The reliability of the assessment of endoscopic laryngeal findings associated with laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope* (2002) 112:1019-1024.
29. Bredenoord, A.J. Impedance-ph monitoring: New standard for measuring gastro-oesophageal reflux. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* (2008) 20:434-439.
30. Bredenoord, A.J., Pandolfino, J.E., Smout, A.J. Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* (2013) 381:1933-1942.
31. Brigger, M.T., Sipp, J.A., Hartnick, C.J. Tracheal ph monitoring: A pilot study in tracheostomy dependent children. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* (2009) 73:999-1001.
32. Bujanda, L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* (2000) 95:3374-3382.
33. Bulmer, D.M., Ali, M.S., Brownlee, I.A., Dettmar, P.W., Pearson, J.P. Laryngeal mucosa: Its susceptibility to damage by acid and pepsin. *Laryngoscope* (2010) 120:777-782.
34. Callaghan, J.M., Tan, S.S., Khan, M.A., Curran, K.A., Campbell, W.G., Smolka, A.J., Toh, B.H., Gleeson, P.A., Wingo, C.S., Cain, B.D. Renal expression of the gene encoding the gastric h(+)-k(+)-atpase beta-subunit. *Am J Physiol* (1995) 268:F363-374.
35. Calvo-Henriquez, C., Ruano-Ravina, A., Vaamonde, P., Martinez-Capoccioni, G., Martin-Martin, A.C. Is pepsin a reliable marker of laryngopharyngeal reflux? A systematic review. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2017):194599817709430.
36. Canani, R.B., Cirillo, P., Roggero, P., Romano, C., Malamisura, B., Terrin, G., Passariello, A., Manguso, F., Morelli, L., Guarino, A. Therapy with gastric acidity inhibitors increases the risk of acute gastroenteritis and community-acquired pneumonia in children. *Pediatrics* (2006) 117:e817-820.
37. Canning, B.J. Encoding of the cough reflex. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* (2007) 20:396-401.
38. Carrau, R.L., Khidr, A., Gold, K.F., Crawley, J.A., Hillson, E.M., Koufman, J.A., Pashos, C.L. Validation of a quality-of-life instrument for laryngopharyngeal reflux. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (2005) 131:315-320.
39. Champoux, J.J., Schultz, S.J. Ribonuclease h: Properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. *The FEBS journal* (2009) 276:1506-1516.
40. Chappity, P., Kumar, R., Deka, R.C., Chokkalingam, V., Saraya, A., Sikka, K. Proton pump inhibitors versus solitary lifestyle modification in management of laryngopharyngeal reflux and evaluating who is at risk: Scenario in a developing country. *Clinical medicine insights. Ear, nose and throat* (2014) 7:1-5.
41. Chattopadhyay, D.K., Greaney, M.G., Irvin, T.T. Effect of cigarette smoking on the lower oesophageal sphincter. *Gut* (1977) 18:833-835.
42. Cheung, T.K., Lam, B., Lam, K.F., Ip, M., Ng, C., Kung, R., Wong, B.C. Gastroesophageal reflux disease is associated with poor asthma control,

- quality of life, and psychological status in chinese asthma patients. *Chest* (2009) 135:1181-1185.
43. Chheda, N.N., Seybt, M.W., Schade, R.R., Postma, G.N. Normal values for pharyngeal ph monitoring. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2009) 118:166-171.
 44. Chiou, E. Diagnosis of supra-esophageal gastric reflux: Correlation of oropharyngeal ph with esophageal impedance monitoring for gastroesophageal reflux. (2011) 23:717-e326.
 45. Chong, V.H., Jaliha, A. Heterotopic gastric mucosal patch of the esophagus is associated with higher prevalence of laryngopharyngeal reflux symptoms. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2010) 267:1793-1799.
 46. Cohen, L.B., Johnson, D.A., Ganz, R.A., Aisenberg, J., Deviere, J., Foley, T.R., Haber, G.B., Peters, J.H., Lehman, G.A. Enteryx implantation for gerd: Expanded multicenter trial results and interim postapproval follow-up to 24 months. *Gastrointest Endosc* (2005) 61:650-658.
 47. Cohen, S. Pathogenesis of coffee-induced gastrointestinal symptoms. *The New England journal of medicine* (1980) 303:122-124.
 48. Cohen, S., Booth, G.H., Jr. Gastric acid secretion and lower-esophageal-sphincter pressure in response to coffee and caffeine. *The New England journal of medicine* (1975) 293:897-899.
 49. Coleman, H.G., Bhat, S., Murray, L.J., McManus, D., Gavin, A.T., Johnston, B.T. Increasing incidence of barrett's oesophagus: A population-based study. *European journal of epidemiology* (2011) 26:739-745.
 50. Compte, L., Garrigues, V., Perpina, M., Ponce, J. Prevalence of gastroesophageal reflux in asthma. *J Asthma* (2000) 37:175-182.
 51. Connor, N.P., Palazzi-Churas, K.L., Cohen, S.B., Levenson, G.E., Bless, D.M. Symptoms of extraesophageal reflux in a community-dwelling sample. *J Voice* (2007) 21:189-202.
 52. Cook, M.B., Wild, C.P., Forman, D. A systematic review and meta-analysis of the sex ratio for barrett's esophagus, erosive reflux disease, and nonerosive reflux disease. *American journal of epidemiology* (2005) 162:1050-1061.
 53. Copper, M.P., Smit, C.F., Stanojcic, L.D., Devriese, P.P., Schouwenburg, P.F., Mathus-Vliegen, L.M. High incidence of laryngopharyngeal reflux in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* (2000) 110:1007-1011.
 54. de Jonge, P.J., van Blankenstein, M., Grady, W.M., Kuipers, E.J. Barrett's oesophagus: Epidemiology, cancer risk and implications for management. *Gut* (2014) 63:191-202.
 55. Delahunty, J.E. Acid laryngitis. *J Laryngol Otol* (1972) 86:335-342.
 56. DeMeester, T.R., Mason, R.J., Filipi, C.J. [endoscopic intraluminal valvuloplasty--a therapy of the future for gastroesophageal reflux]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* (1998) 69:158-162.
 57. DeMeester, T.R., Peters, J.H., Bremner, C.G., Chandrasoma, P. Biology of gastroesophageal reflux disease: Pathophysiology relating to medical and surgical treatment. *Annual review of medicine* (1999) 50:469-506.
 58. Dent, J., Dodds, W.J., Friedman, R.H., Sekiguchi, T., Hogan, W.J., Arndorfer, R.C., Petrie, D.J. Mechanism of gastroesophageal reflux in

- recumbent asymptomatic human subjects. *The Journal of clinical investigation* (1980) 65:256-267.
59. DeVault, K.R., Castell, D.O. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* (2005) 100:190-200.
 60. Dore, M.P., Pedroni, A., Pes, G.M., Maragkoudakis, E., Tadeu, V., Pirina, P., Realdi, G., Delitala, G., Malaty, H.M. Effect of antisecretory therapy on atypical symptoms in gastroesophageal reflux disease. *Digestive diseases and sciences* (2007) 52:463-468.
 61. Dua, K., Bardan, E., Ren, J., Sui, Z., Shaker, R. Effect of chronic and acute cigarette smoking on the pharyngo-upper oesophageal sphincter contractile reflex and reflexive pharyngeal swallow. *Gut* (1998) 43:537-541.
 62. Eckley, C.A., Michelsohn, N., Rizzo, L.V., Tadokoro, C.E., Costa, H.O. Salivary epidermal growth factor concentration in adults with reflux laryngitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2004) 131:401-406.
 63. Eherer, A. Management of gastroesophageal reflux disease: Lifestyle modification and alternative approaches. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* (2014) 32:149-151.
 64. Eherer, A.J., Habermann, W., Hammer, H.F., Kiesler, K., Friedrich, G., Krejs, G.J. Effect of pantoprazole on the course of reflux-associated laryngitis: A placebo-controlled double-blind crossover study. *Scand J Gastroenterol* (2003) 38:462-467.
 65. Eherer, A.J., Netolitzky, F., Hogenauer, C., Puschnig, G., Hinterleitner, T.A., Scheidl, S., Kraxner, W., Krejs, G.J., Hoffmann, K.M. Positive effect of abdominal breathing exercise on gastroesophageal reflux disease: A randomized, controlled study. *Am J Gastroenterol* (2012) 107:372-378.
 66. Eisen, G.M., Sandler, R.S., Murray, S., Gottfried, M. The relationship between gastroesophageal reflux disease and its complications with barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* (1997) 92:27-31.
 67. Eisenberg, E., Levanon, E.Y. Human housekeeping genes are compact. *Trends in genetics : TIG* (2003) 19:362-365.
 68. El-Serag, H.B. Epidemiology of non-erosive reflux disease. *Digestion* (2008) 1:6-10.
 69. El-Serag, H.B., Lee, P., Buchner, A., Inadomi, J.M., Gavin, M., McCarthy, D.M. Lansoprazole treatment of patients with chronic idiopathic laryngitis: A placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol* (2001) 96:979-983.
 70. Enzinger, P.C., Mayer, R.J. Esophageal cancer. *The New England journal of medicine* (2003) 349:2241-2252.
 71. Eom, C.S., Park, S.M., Myung, S.K., Yun, J.M., Ahn, J.S. Use of acid-suppressive drugs and risk of fracture: A meta-analysis of observational studies. *Annals of family medicine* (2011) 9:257-267.
 72. Fackler, W.K., Ours, T.M., Vaezi, M.F., Richter, J.E. Long-term effect of h2ra therapy on nocturnal gastric acid breakthrough. *Gastroenterology* (2002) 122:625-632.
 73. Fass, R., Quan, S.F., O'Connor, G.T., Ervin, A., Iber, C. Predictors of heartburn during sleep in a large prospective cohort study. *Chest* (2005) 127:1658-1666.

74. Feldman, M., Barnett, C. Relationships between the acidity and osmolality of popular beverages and reported postprandial heartburn. *Gastroenterology* (1995) 108:125-131.
75. Feng, G., Wang, J., Zhang, L., Liu, Y. A study to draw a normative database of laryngopharynx ph profile in chinese. *J Neurogastroenterol Motil* (2014).
76. Feretis, C., Benakis, P., Dimopoulos, C., Dailianas, A., Filalithis, P., Stamou, K.M., Manouras, A., Apostolidis, N. Endoscopic implantation of plexiglas (pmma) microspheres for the treatment of gerd. *Gastrointest Endosc* (2001) 53:423-426.
77. Filipi, C.J., Lehman, G.A., Rothstein, R.I., Raijman, I., Stiegmann, G.V., Waring, J.P., Hunter, J.G., Gostout, C.J., Edmundowicz, S.A., Dunne, D.P., Watson, P.A., Cornet, D.A. Transoral, flexible endoscopic suturing for treatment of gerd: A multicenter trial. *Gastrointest Endosc* (2001) 53:416-422.
78. Ford, C.N. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux. *Jama* (2005) 294:1534-1540.
79. Foster, A., Richards, W.O., McDowell, J., Laws, H.L., Clements, R.H. Gastrointestinal symptoms are more intense in morbidly obese patients. *Surgical endoscopy* (2003) 17:1766-1768.
80. Franchi, A., Brogelli, B., Massi, D., Santucci, M., De Campora, E., Gallo, O. Dilation of intercellular spaces is associated with laryngo-pharyngeal reflux: An ultrastructural morphometric analysis of laryngeal epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2007) 264:907-911.
81. Fraser-Moodie, C.A., Norton, B., Gornall, C., Magnago, S., Weale, A.R., Holmes, G.K. Weight loss has an independent beneficial effect on symptoms of gastro-oesophageal reflux in patients who are overweight. *Scand J Gastroenterol* (1999) 34:337-340.
82. Frazzoni, M., De Micheli, E., Savarino, V. Different patterns of oesophageal acid exposure distinguish complicated reflux disease from either erosive reflux oesophagitis or non-erosive reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2003) 18:1091-1098.
83. Friedman, M., Maley, A., Kelley, K., Pulver, T., Foster, M., Fisher, M., Joseph, N. Impact of ph monitoring on laryngopharyngeal reflux treatment: Improved compliance and symptom resolution. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2011) 144:558-562.
84. Fujii, T., Fujita, K., Takeguchi, N., Sakai, H. Function of k(+)-cl(-) cotransporters in the acid secretory mechanism of gastric parietal cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* (2011) 34:810-812.
85. Galan, A.R., Katzka, D.A., Castell, D.O. Acid secretion from an esophageal inlet patch demonstrated by ambulatory ph monitoring. *Gastroenterology* (1998) 115:1574-1576.
86. Galli, J., Cammarota, G., Volante, M., De Corso, E., Almadori, G., Paludetti, G. Laryngeal carcinoma and laryngo-pharyngeal reflux disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital* (2006) 26:260-263.
87. Gatenby, P.A., Ramus, J.R., Caygill, C.P., Shepherd, N.A., Watson, A. Relevance of the detection of intestinal metaplasia in non-dysplastic columnar-lined oesophagus. *Scand J Gastroenterol* (2008) 43:524-530.

88. Gatta, L., Vaira, D., Sorrenti, G., Zucchini, S., Sama, C., Vakil, N. Meta-analysis: The efficacy of proton pump inhibitors for laryngeal symptoms attributed to gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* (2007) 25:385-392.
89. Genta, R.M., Spechler, S.J., Kielhorn, A.F. The los angeles and savary-miller systems for grading esophagitis: Utilization and correlation with histology. *Dis Esophagus* (2011) 24:10-17.
90. Haenisch, B., von Holt, K., Wiese, B., Prokein, J., Lange, C., Ernst, A., Brettschneider, C., König, H.H., Werle, J., Weyerer, S., Lupp, M., Riedel-Heller, S.G., Fuchs, A., Pentzek, M., Weeg, D., Bickel, H., Broich, K., Jessen, F., Maier, W., Scherer, M. Risk of dementia in elderly patients with the use of proton pump inhibitors. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* (2015) 265:419-428.
91. Hall, K., Perez, G., Anderson, D., Gutierrez, C., Munson, K., Hersey, S.J., Kaplan, J.H., Sachs, G. Location of the carbohydrates present in the h_k-atpase vesicles isolated from hog gastric mucosa. *Biochemistry* (1990) 29:701-706.
92. Hamilton, J.W., Boisen, R.J., Yamamoto, D.T., Wagner, J.L., Reichelderfer, M. Sleeping on a wedge diminishes exposure of the esophagus to refluxed acid. *Digestive diseases and sciences* (1988) 33:518-522.
93. Hampel, H., Abraham, N.S., El-Serag, H.B. Meta-analysis: Obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* (2005) 143:199-211.
94. Han, H.L., Zhao, J.H., Zhang, Y.L., Wang, M., Wang, H.F., Cheng, J.N., Feng, Y., Luo, K.Q., Lyu, Q.P. [preliminary application of dx-ph monitoring system in laryngopharyngeal reflux disease]. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery* (2016) 51:666-670.
95. Hanson, D.G., Jiang, J.J. Diagnosis and management of chronic laryngitis associated with reflux. *Am J Med* (2000) 108 Suppl 4a:112s-119s.
96. Harding, S.M. Gastroesophageal reflux: A potential asthma trigger. *Immunol Allergy Clin North Am* (2005) 25:131-148.
97. Harding, S.M. Recent clinical investigations examining the association of asthma and gastroesophageal reflux. *Am J Med* (2003) 18:39S-44S.
98. Harding, S.M., Allen, J.E., Blumin, J.H., Warner, E.A., Pellegrini, C.A., Chan, W.W. Respiratory manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2013) 1300:43-52.
99. Hart, A.M. Evidence-based recommendations for gerd treatment. *The Nurse practitioner* (2013) 38:26-34; quiz 34-25.
100. Haukioja, A., Soderling, E., Tenovuo, J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries research* (2008) 42:449-453.
101. Hayeck, T.J., Kong, C.Y., Spechler, S.J., Gazelle, G.S., Hur, C. The prevalence of barrett's esophagus in the us: Estimates from a simulation model confirmed by seer data. *Dis Esophagus* (2010) 23:451-457.

102. Herrmann, M., Selige, J., Raffael, S., Sachs, G., Brambilla, A., Klein, T. Systematic expression profiling of the gastric h+/k+ atpase in human tissue. *Scand J Gastroenterol* (2007) 42:1275-1288.
103. Hersey, S.J., Sachs, G. Gastric acid secretion. *Physiol Rev* (1995) 75:155-189.
104. Herzig, S.J., Howell, M.D., Ngo, L.H., Marcantonio, E.R. Acid-suppressive medication use and the risk for hospital-acquired pneumonia. *Jama* (2009) 301:2120-2128.
105. Hicks, D.M., Ours, T.M., Abelson, T.I., Vaezi, M.F., Richter, J.E. The prevalence of hypopharynx findings associated with gastroesophageal reflux in normal volunteers. *J Voice* (2002) 16:564-579.
106. Hickson, C., Simpson, C.B., Falcon, R. Laryngeal pseudosulcus as a predictor of laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* (2001) 111:1742-1745.
107. Holtmann, G. Reflux disease: The disorder of the third millennium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* (2001) 13:S5-11.
108. Hopkins, C., Yousaf, U., Pedersen, M. Acid reflux treatment for hoarseness. *Cochrane Database Syst Rev* (2006) 25.
109. Howell, M.D., Novack, V., Grgurich, P., Soulliard, D., Novack, L., Pencina, M., Talmor, D. Iatrogenic gastric acid suppression and the risk of nosocomial clostridium difficile infection. *Arch Intern Med* (2010) 170:784-790.
110. Hunt, R. Acid suppression for reflux disease: "Off-the-peg" or a tailored approach? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* (2012) 10:210-213.
111. Hvid-Jensen, F., Pedersen, L., Drewes, A.M., Sorensen, H.T., Funch-Jensen, P. Incidence of adenocarcinoma among patients with barrett's esophagus. *The New England journal of medicine* (2011) 365:1375-1383.
112. Irwin, R.S., French, C.L., Curley, F.J., Zawacki, J.K., Bennett, F.M. Chronic cough due to gastroesophageal reflux. Clinical, diagnostic, and pathogenetic aspects. *Chest* (1993) 104:1511-1517.
113. Jabbari, M., Goresky, C.A., Lough, J., Yaffe, C., Daly, D., Cote, C. The inlet patch: Heterotopic gastric mucosa in the upper esophagus. *Gastroenterology* (1985) 89:352-356.
114. Jacob, P., Kahrilas, P.J., Herzon, G. Proximal esophageal ph-metry in patients with 'reflux laryngitis'. *Gastroenterology* (1991) 100:305-310.
115. Johnson, D.A., Benjamin, S.B., Vakil, N.B., Goldstein, J.L., Lamet, M., Whipple, J., Damico, D., Hamelin, B. Esomeprazole once daily for 6 months is effective therapy for maintaining healed erosive esophagitis and for controlling gastroesophageal reflux disease symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety. *Am J Gastroenterol* (2001) 96:27-34.
116. Johnston, N., Bulmer, D., Gill, G.A., Panetti, M., Ross, P.E., Pearson, J.P., Pignatelli, M., Axford, S.E., Dettmar, P.W., Koufman, J.A. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: Further studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2003) 112:481-491.
117. Joo, Y.H., Song, Y.S., Pae, C.U. Relationship between depression and laryngopharyngeal reflux. *Psychiatry investigation* (2017) 14:226-229.

118. Joshi, A.A., Chiplunkar, B.G., Bradoo, R.A. Assessment of treatment response in patients with laryngopharyngeal reflux. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India* (2017) 69:77-80.
119. Kahrilas, P.J., Gupta, R.R. The effect of cigarette smoking on salivation and esophageal acid clearance. *The Journal of laboratory and clinical medicine* (1989) 114:431-438.
120. Kaltenbach, T., Crockett, S., Gerson, L.B. Are lifestyle measures effective in patients with gastroesophageal reflux disease? An evidence-based approach. *Arch Intern Med* (2006) 166:965-971.
121. Kaufman, S.E., Kaye, M.D. Induction of gastro-oesophageal reflux by alcohol. *Gut* (1978) 19:336-338.
122. Kellerman, R., Kintanar, T. Gastroesophageal reflux disease. *Primary care* (2017) 44:561-573.
123. Khan, M., Santana, J., Donnellan, C., Preston, C., Moayyedi, P. Medical treatments in the short term management of reflux oesophagitis. *Cochrane Database Syst Rev* (2007):Cd003244.
124. Kiljander, T.O., Laitinen, J.O. The prevalence of gastroesophageal reflux disease in adult asthmatics. *Chest* (2004) 126:1490-1494.
125. Koch, O.O., Antoniou, S.A., Kaindlstorfer, A., Asche, K.U., Granderath, F.A., Pointner, R. Effectiveness of laparoscopic total and partial fundoplication on extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: A randomized study. *Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques* (2012) 22:387-391.
126. Koufman, J., Sataloff, R.T., Toohill, R. Laryngopharyngeal reflux: Consensus conference report. *J Voice* (1996) 10:215-216.
127. Koufman, J.A. Laryngopharyngeal reflux is different from classic gastroesophageal reflux disease. *Ear Nose Throat J* (2002) 81:7-9.
128. Koufman, J.A. 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) 101:1-78.
129. Koufman, J.A., Aviv, J.E., Casiano, R.R., Shaw, G.Y. 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) 127:32-35.
130. Koufman, J.A., Wiener, G.J., Wu, W.C., Castell, D.O. Reflux laryngitis and its sequelae: The diagnostic role of ambulatory 24-hour ph monitoring. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation* (1988) 2:78-89.
131. Kraut, J.A., Helander, K.G., Helander, H.F., Iroezi, N.D., Marcus, E.A., Sachs, G. Detection and localization of h⁺-k⁺-atpase isoforms in human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* (2001) 281:F763-768.
132. Kwok, C.S., Yeong, J.K., Loke, Y.K. Meta-analysis: Risk of fractures with acid-suppressing medication. *Bone* (2011) 48:768-776.
133. Kwon, Y.S., Oelschlager, B.K., Merati, A.L. Evaluation and treatment of laryngopharyngeal reflux symptoms. *Thoracic surgery clinics* (2011) 21:477-487.

134. Lam, J.R., Schneider, J.L., Zhao, W., Corley, D.A. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin b12 deficiency. *Jama* (2013) 310:2435-2442.
135. Lam, P.K., Ng, M.L., Cheung, T.K., Wong, B.Y., Tan, V.P., Fong, D.Y., Wei, W.I., Wong, B.C. Rabeprazole is effective in treating laryngopharyngeal reflux in a randomized placebo-controlled trial. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* (2010) 8:770-776.
136. Lau, Y.T., Ahmed, N.N. Fracture risk and bone mineral density reduction associated with proton pump inhibitors. *Pharmacotherapy* (2012) 32:67-79.
137. Layden, T.J., Agnone, L.M., Schmidt, L.N., Hakim, B., Goldstein, J.L. Rabbit esophageal cells possess an na⁺,h⁺ antiport. *Gastroenterology* (1990) 99:909-917.
138. Lechien, J.R., Akst, L.M., Hamdan, A.L., Schindler, A., Karkos, P.D., Barillari, M.R., Calvo-Henriquez, C., Crevier-Buchman, L., Finck, C., Eun, Y.G., Saussez, S., Vaezi, M.F. Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux disease: State of the art review. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2019) 160:762-782.
139. Leonard, J., Marshall, J.K., Moayyedi, P. Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol* (2007) 102:2047-2056; quiz 2057.
140. Lepage, C., Rachet, B., Jooste, V., Faivre, J., Coleman, M.P. Continuing rapid increase in esophageal adenocarcinoma in england and wales. *Am J Gastroenterol* (2008) 103:2694-2699.
141. Lew, R.J., Kochman, M.L. A review of endoscopic methods of esophageal dilation. *Journal of clinical gastroenterology* (2002) 35:117-126.
142. Lipan, M.J., Reidenberg, J.S., Laitman, J.T. Anatomy of reflux: A growing health problem affecting structures of the head and neck. *Anat Rec B New Anat* (2006) 289:261-270.
143. Locke, G.R., 3rd, Talley, N.J., Fett, S.L., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., 3rd Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Med* (1999) 106:642-649.
144. Logan, I.C., Sumukadas, D., Witham, M.D. Gastric acid suppressants--too much of a good thing? *Age and ageing* (2010) 39:410-411.
145. Lundell, L.R., Dent, J., Bennett, J.R., Blum, A.L., Armstrong, D., Galimiche, J.P., Johnson, F., Hongo, M., Richter, J.E., Spechler, S.J., Tytgat, G.N., Wallin, L. Endoscopic assessment of oesophagitis: Clinical and functional correlates and further validation of the los angeles classification. *Gut* (1999) 45:172-180.
146. Martinucci, I., de Bortoli, N., Savarino, E., Nacci, A., Romeo, S.O., Bellini, M., Savarino, V., Fattori, B., Marchi, S. Optimal treatment of laryngopharyngeal reflux disease. *Therapeutic advances in chronic disease* (2013) 4:287-301.
147. Mathus-Vliegen, E.M., Tygat, G.N. Gastro-oesophageal reflux in obese subjects: Influence of overweight, weight loss and chronic gastric balloon distension. *Scand J Gastroenterol* (2002) 37:1246-1252.
148. McGlashan, J.A., Johnstone, L.M., Sykes, J., Strugala, V., Dettmar, P.W. The value of a liquid alginate suspension (gaviscon advance) in the

- management of laryngopharyngeal reflux. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2009) 266:243-251.
149. Meining, A., Classen, M. The role of diet and lifestyle measures in the pathogenesis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* (2000) 95:2692-2697.
 150. Merati, A.L., Lim, H.J., Ulualp, S.O., Toohill, R.J. Meta-analysis of upper probe measurements in normal subjects and patients with laryngopharyngeal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2005) 114:177-182.
 151. Monnier, P., Savary, M. Contribution of endoscopy to gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol.* (1984) 19(Suppl 106):26.
 152. Morrison, M.D. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma? *Otolaryngol Head Neck Surg* (1988) 99:370-373.
 153. Murphy, D.W., Castell, D.O. Chocolate and heartburn: Evidence of increased esophageal acid exposure after chocolate ingestion. *Am J Gastroenterol* (1988) 83:633-636.
 154. Murray, L., Johnston, B., Lane, A., Harvey, I., Donovan, J., Nair, P., Harvey, R. Relationship between body mass and gastro-oesophageal reflux symptoms: The bristol helicobacter project. *International journal of epidemiology* (2003) 32:645-650.
 155. Nandurkar, S., Locke, G.R., 3rd, Fett, S., Zinsmeister, A.R., Cameron, A.J., Talley, N.J. Relationship between body mass index, diet, exercise and gastro-oesophageal reflux symptoms in a community. *Aliment Pharmacol Ther* (2004) 20:497-505.
 156. Nelsen, E.M., Hawes, R.H., Iyer, P.G. Diagnosis and management of barrett's esophagus. *The Surgical clinics of North America* (2012) 92:1135-1154.
 157. Ness-Jensen, E., Lindam, A., Lagergren, J., Hveem, K. Tobacco smoking cessation and improved gastroesophageal reflux: A prospective population-based cohort study: The hunt study. *Am J Gastroenterol* (2014) 109:171-177.
 158. Ngamruengphong, S., Leontiadis, G.I., Radhi, S., Dentino, A., Nugent, K. Proton pump inhibitors and risk of fracture: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Am J Gastroenterol* (2011) 106:1209-1218; quiz 1219.
 159. Nguyen, H.N., Silny, J., Matern, S. Multiple intraluminal electrical impedancometry for recording of upper gastrointestinal motility: Current results and further implications. *Am J Gastroenterol* (1999) 94:306-317.
 160. Nilsson, M., Johnsen, R., Ye, W., Hveem, K., Lagergren, J. Obesity and estrogen as risk factors for gastroesophageal reflux symptoms. *Jama* (2003) 290:66-72.
 161. Noone, A.M., Cronin, K.A., Altekruse, S.F., Howlader, N., Lewis, D.R., Petkov, V.I., Penberthy, L. Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance epidemiology and end results program, 1992-2013. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* (2017) 26:632-641.
 162. Noordzij, J.P., Khidr, A., Desper, E., Meek, R.B., Reibel, J.F., Levine, P.A. Correlation of ph probe-measured laryngopharyngeal reflux with

- symptoms and signs of reflux laryngitis. *Laryngoscope* (2002) 112:2192-2195.
163. Noordzij, J.P., Khidr, A., Evans, B.A., Desper, E., Mittal, R.K., Reibel, J.F., Levine, P.A. Evaluation of omeprazole in the treatment of reflux laryngitis: A prospective, placebo-controlled, randomized, double-blind study. *Laryngoscope* (2001) 111:2147-2151.
 164. Ollyo, J.B., Monnier, P., Fontolliet, C., Birchler, R., Fasel, J., Levi, F., Gonvers, J.J. [savary's ulcer: A new complication of gastroesophageal reflux? Apropos of 32 endoscopically observed cases]. *Schweiz Med Wochenschr* (1988) 118:823-827.
 165. Orr, W.C., Harnish, M.J. Sleep-related gastro-oesophageal reflux: Provocation with a late evening meal and treatment with acid suppression. *Aliment Pharmacol Ther* (1998) 12:1033-1038.
 166. Ossakow, S.J., Elta, G., Colturi, T., Bogdasarian, R., Nostrant, T.T. Esophageal reflux and dysmotility as the basis for persistent cervical symptoms. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (1987) 96:387-392.
 167. Ozturk, O., Oz, F., Karakullukcu, B., Oghan, F., Guclu, E., Ada, M. Hoarseness and laryngopharyngeal reflux: A cause and effect relationship or coincidence? *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2006) 263:935-939.
 168. Pace, F., Pallotta, S., Tonini, M., Vakil, N., Bianchi Porro, G. Systematic review: Gastro-oesophageal reflux disease and dental lesions. *Aliment Pharmacol Ther* (2008) 27:1179-1186.
 169. Parasa, S., Sharma, P. Complications of gastro-oesophageal reflux disease. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* (2013) 27:433-442.
 170. Park, S., Chun, H.J., Keum, B., Uhm, C.S., Baek, S.K., Jung, K.Y., Lee, S.J. An electron microscopic study--correlation of gastroesophageal reflux disease and laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* (2010) 120:1303-1308.
 171. Park, W., Hicks, D.M., Khandwala, F., Richter, J.E., Abelson, T.I., Milstein, C., Vaezi, M.F. Laryngopharyngeal reflux: Prospective cohort study evaluating optimal dose of proton-pump inhibitor therapy and pretherapy predictors of response. *Laryngoscope* (2005) 115:1230-1238.
 172. Paterson, W.G. Extraesophageal complications of gastroesophageal reflux disease. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* (1997) 11 Suppl B:45b-50b.
 173. Patigaroo, S.A., Hashmi, S.F., Hasan, S.A., Ajmal, M.R., Mehfooz, N. Clinical manifestations and role of proton pump inhibitors in the management of laryngopharyngeal reflux. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India* (2011) 63:182-189.
 174. Peters, J.H., Silverman, D.E., Stein, A. Lower esophageal sphincter injection of a biocompatible polymer: Accuracy of implantation assessed by esophagectomy. *Surgical endoscopy* (2003) 17:547-550.
 175. Poe, R.H., Kallay, M.C. Chronic cough and gastroesophageal reflux disease: Experience with specific therapy for diagnosis and treatment. *Chest* (2003) 123:679-684.
 176. Postma, G.N., Tomek, M.S., Belafsky, P.C., Koufman, J.A. Esophageal motor function in laryngopharyngeal reflux is superior to that in classic

- gastroesophageal reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2001) 110:1114-1116.
177. Pregun, I., Hritz, I., Tulassay, Z., Herszenyi, L. Peptic esophageal stricture: Medical treatment. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* (2009) 27:31-37.
178. Price, J.C., Jansen, C.J., Johns, M.E. Esophageal reflux and secondary malignant neoplasia at laryngoesophagectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (1990) 116:163-164.
179. Price, S.F., Smithson, K.W., Castell, D.O. Food sensitivity in reflux esophagitis. *Gastroenterology* (1978) 75:240-243.
180. Qadeer, M.A., Colabianchi, N., Vaezi, M.F. Is gerd a risk factor for laryngeal cancer? *Laryngoscope* (2005) 115:486-491.
181. Qadeer, M.A., Swoger, J., Milstein, C., Hicks, D.M., Ponsky, J., Richter, J.E., Abelson, T.I., Vaezi, M.F. Correlation between symptoms and laryngeal signs in laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope* (2005) 115:1947-1952.
182. Reichel, O., Dressel, H., Wiederanders, K., Issing, W.J. Double-blind, placebo-controlled trial with esomeprazole for symptoms and signs associated with laryngopharyngeal reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2008) 139:414-420.
183. Reichel, O., Issing, W.J. Should patients with ph-documented laryngopharyngeal reflux routinely undergo oesophagogastroduodenoscopy? A retrospective analysis. *J Laryngol Otol* (2007) 121:1165-1169.
184. Reuben, M.A., Lasater, L.S., Sachs, G. Characterization of a beta subunit of the gastric h+/k(+)-transporting atpase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87:6767-6771.
185. Ribeiro, R.H.T., Ribeiro, F.A., Silva, R.P.M., Bortolini, M.J.S., Garrote-Filho, M.D.S., Penha-Silva, N. Depression, hematologic parameters, and blood levels of vitamin b12 in patients with laryngopharyngeal reflux under use of proton pump inhibitors. *Clinical medicine insights. Ear, nose and throat* (2019) 12:1179550619828683.
186. Richards, D.A. Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of cimetidine and ranitidine. *Journal of clinical gastroenterology* (1983) 5 Suppl 1:81-90.
187. Riphaut, A., Wehrmann, T., Weber, B., Arnold, J., Beilenhoff, U., Bitter, H., von Delius, S., Domagk, D., Ehlers, A.F., Faiss, S., Hartmann, D., Heinrichs, W., Hermans, M.L., Hofmann, C., In der Smitten, S., Jung, M., Kahler, G., Kraus, M., Martin, J., Meining, A., Radke, J., Rosch, T., Seifert, H., Sieg, A., Wigglinghaus, B., Kopp, I. [s3-guidelines--sedation in gastrointestinal endoscopy]. *Z Gastroenterol* (2008) 46:1298-1330.
188. Ronkainen, J., Aro, P., Storskrubb, T., Johansson, S.E., Lind, T., Bolling-Sternevald, E., Graffner, H., Vieth, M., Stolte, M., Engstrand, L., Talley, N.J., Agreus, L. High prevalence of gastroesophageal reflux symptoms and esophagitis with or without symptoms in the general adult swedish population: A kalixanda study report. *Scand J Gastroenterol* (2005) 40:275-285.
189. Ronkainen, J., Aro, P., Storskrubb, T., Johansson, S.E., Lind, T., Bolling-Sternevald, E., Vieth, M., Stolte, M., Talley, N.J., Agreus, L. Prevalence of

- barrett's esophagus in the general population: An endoscopic study. *Gastroenterology* (2005) 129:1825-1831.
190. Rotman, S.R., Bishop, T.F. Proton pump inhibitor use in the u.S. Ambulatory setting, 2002-2009. *PloS one* (2013) 8:e56060.
 191. Roussa, E., Thevenod, F. Distribution of v-atpase in rat salivary glands. *European journal of morphology* (1998) 36 Suppl:147-152.
 192. Roussa, E., Thevenod, F., Sabolic, I., Herak-Kramberger, C.M., Nastainczyk, W., Bock, R., Schulz, I. Immunolocalization of vacuolar-type h⁺-atpase in rat submandibular gland and adaptive changes induced by acid-base disturbances. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* (1998) 46:91-100.
 193. Rubinstein, E., Hauge, C., Sommer, P., Mortensen, T. Oesophageal and gastric potential difference and ph in healthy volunteers following intake of coca-cola, red wine, and alcohol. *Pharmacology & toxicology* (1993) 72:61-65.
 194. Sachs, G., Shin, J.M., Howden, C.W. Review article: The clinical pharmacology of proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* (2006) 2:2-8.
 195. Sahin, M., Vardar, R., Ersin, S., Kirazli, T., Ogut, M.F., Akyildiz, N.S., Bor, S. The effect of antireflux surgery on laryngeal symptoms, findings and voice parameters. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2015) 272:3375-3383.
 196. Scarpignato, C., Pelosini, I., Di Mario, F. Acid suppression therapy: Where do we go from here? *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* (2006) 24:11-46.
 197. Schindlbeck, N.E., Heinrich, C., Dendorfer, A., Pace, F., Muller-Lissner, S.A. Influence of smoking and esophageal intubation on esophageal ph-metry. *Gastroenterology* (1987) 92:1994-1997.
 198. Schroeder, P.L., Filler, S.J., Ramirez, B., Lazarchik, D.A., Vaezi, M.F., Richter, J.E. Dental erosion and acid reflux disease. *Ann Intern Med* (1995) 122:809-815.
 199. Schubert, M.L. Gastric secretion. *Current opinion in gastroenterology* (2011) 27:536-542.
 200. Shaker, R., Milbrath, M., Ren, J., Toohill, R., Hogan, W.J., Li, Q., Hofmann, C.L. Esophagopharyngeal distribution of refluxed gastric acid in patients with reflux laryngitis. *Gastroenterology* (1995) 109:1575-1582.
 201. Shapiro, D.J. Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and rna. *Anal. Biochem.* (1981) 110:229-231.
 202. Sharma, P. Clinical practice. Barrett's esophagus. *The New England journal of medicine* (2009) 361:2548-2556.
 203. Shay, S., Tutuian, R., Sifrim, D., Vela, M., Wise, J., Balaji, N., Zhang, X., Adhami, T., Murray, J., Peters, J., Castell, D. Twenty-four hour ambulatory simultaneous impedance and ph monitoring: A multicenter report of normal values from 60 healthy volunteers. *Am J Gastroenterol* (2004) 99:1037-1043.
 204. Shull, G.E., Lingrel, J.B. Molecular cloning of the rat stomach (h⁺ + k⁺)-atpase. *J Biol Chem* (1986) 261:16788-16791.
 205. Sifrim, D., Castell, D., Dent, J., Kahrilas, P.J. Gastro-oesophageal reflux monitoring: Review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut* (2004) 53:1024-1031.

206. Simpson, I.J., Marshall, M.R., Pilmore, H., Manley, P., Williams, L., Thein, H., Voss, D. Proton pump inhibitors and acute interstitial nephritis: Report and analysis of 15 cases. *Nephrology (Carlton, Vic.)* (2006) 11:381-385.
207. Simpson, W.G. Gastroesophageal reflux disease and asthma. *Diagnosis and management. Arch Intern Med* (1995) 155:798-803.
208. Sivarao, D.V., Goyal, R.K. Functional anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. *Am J Med* (2000) 108 Suppl 4a:27s-37s.
209. Sontag, S.J., O'Connell, S., Khandelwal, S., Miller, T., Nemchausky, B., Schnell, T.G., Serlovsky, R. Most asthmatics have gastroesophageal reflux with or without bronchodilator therapy. *Gastroenterology* (1990) 99:613-620.
210. Spantideas, N., Drosou, E., Bougea, A., AlAbdulwahed, R. Proton pump inhibitors for the treatment of laryngopharyngeal reflux. A systematic review. *J Voice* (2019).
211. Stanciu, C., Bennett, J.R. Effects of posture on gastro-oesophageal reflux. *Digestion* (1977) 15:104-109.
212. Standring, S. *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice*: Churchill Livingstone 2008.
213. Stanghellini, V. Relationship between upper gastrointestinal symptoms and lifestyle, psychosocial factors and comorbidity in the general population: Results from the domestic/international gastroenterology surveillance study (digest). *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement* (1999) 231:29-37.
214. Steward, D.L., Wilson, K.M., Kelly, D.H., Patil, M.S., Schwartzbauer, H.R., Long, J.D., Welge, J.A. Proton pump inhibitor therapy for chronic laryngopharyngitis: A randomized placebo-control trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2004) 131:342-350.
215. Sun, G., Muddana, S., Slaughter, J.C., Casey, S., Hill, E., Farrokhi, F., Garrett, C.G., Vaezi, M.F. A new ph catheter for laryngopharyngeal reflux: Normal values. *Laryngoscope* (2009) 119:1639-1643.
216. Suter, M., Dorta, G., Giusti, V., Calmes, J.M. Gastro-esophageal reflux and esophageal motility disorders in morbidly obese patients. *Obesity surgery* (2004) 14:959-966.
217. Tang, P., McKinley, M.J., Sporrer, M., Kahn, E. Inlet patch: Prevalence, histologic type, and association with esophagitis, barrett esophagus, and antritis. *Archives of pathology & laboratory medicine* (2004) 128:444-447.
218. Tauber, S., Gross, M., Issing, W.J. Association of laryngopharyngeal symptoms with gastroesophageal reflux disease. *Laryngoscope* (2002) 112:879-886.
219. Technology, R. Dx-ph system zur oropharyngealen ph-messung. 2017. Webadresse: <http://www.restech-corp.com/clinical.html>. Abgerufen am 22.04.2017.
220. Technology, R. Oropharyngeale ph-metrie corporation 2017. Webadresse: <http://www.restech-orp.com/index.html#solutions>. Abgerufen am 22.04.2017.
221. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of biotechnology* (1999) 75:291-295.

222. Thomas, J.P., Zubiatur, F.M. Over-diagnosis of laryngopharyngeal reflux as the cause of hoarseness. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2012) 13:13.
223. Thompson, W.G., Heaton, K.W. Heartburn and globus in apparently healthy people. *Can Med Assoc J* (1982) 126:46-48.
224. Toohill, R.J., Mushtag, E., Lehman, R.H. Otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux. *Proceedings of XIV World Congress of Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. (1990):3005-3009.
225. Triadafilopoulos, G., Dibaise, J.K., Nostrant, T.T., Stollman, N.H., Anderson, P.K., Edmundowicz, S.A., Castell, D.O., Kim, M.S., Rabine, J.C., Utley, D.S. Radiofrequency energy delivery to the gastroesophageal junction for the treatment of gerd. *Gastrointest Endosc* (2001) 53:407-415.
226. Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., Orlando, C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: Normalization to rna or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical biochemistry* (2002) 309:293-300.
227. Ummarino, D., Vandermeulen, L., Roosens, B., Urbain, D., Hauser, B., Vandenas, Y. Gastroesophageal reflux evaluation in patients affected by chronic cough: Restech versus multichannel intraluminal impedance/ph metry. *Laryngoscope* (2013) 123:980-984.
228. Urushidani, T., Nagao, T. [signal transduction and intracellular recruitment of gastric proton pump in the parietal cell]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* (1997) 110:303-313.
229. Vaezi, M.F., Qadeer, M.A., Lopez, R., Colabianchi, N. Laryngeal cancer and gastroesophageal reflux disease: A case-control study. *Am J Med* (2006) 119:768-776.
230. Vaezi, M.F., Richter, J.E., Stasney, C.R., Spiegel, J.R., Iannuzzi, R.A., Crawley, J.A., Hwang, C., Sostek, M.B., Shaker, R. Treatment of chronic posterior laryngitis with esomeprazole. *Laryngoscope* (2006) 116:254-260.
231. Vailati, C., Mazzoleni, G., Bondi, S., Bussi, M., Testoni, P.A., Passaretti, S. Oropharyngeal ph monitoring for laryngopharyngeal reflux: Is it a reliable test before therapy? *J Voice* (2013) 27:84-89.
232. Vakil, N. Acid inhibition and infections outside the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* (2009) 104 Suppl 2:S17-20.
233. Vakil, N., van Zanten, S.V., Kahrilas, P., Dent, J., Jones, R. The montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: A global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* (2006) 101:1900-1920.
234. van Pinxteren, B., Sigterman, K.E., Bonis, P., Lau, J., Numans, M.E. Short-term treatment with proton pump inhibitors, h2-receptor antagonists and prokinetics for gastro-oesophageal reflux disease-like symptoms and endoscopy negative reflux disease. *Cochrane Database Syst Rev* (2010):Cd002095.
235. Vincent, D., Cohen-Jonathan, A.M., Lepout, J., Merrouche, M., Geronimi, A., Pradalier, A., Soule, J.C. Gastro-oesophageal reflux prevalence and relationship with bronchial reactivity in asthma. *Eur Respir J* (1997) 10:2255-2259.

236. Vitale, G.C., Cheadle, W.G., Patel, B., Sadek, S.A., Michel, M.E., Cuschieri, A. The effect of alcohol on nocturnal gastroesophageal reflux. *Jama* (1987) 258:2077-2079.
237. Wang, J.H., Luo, J.Y., Dong, L., Gong, J., Tong, M. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease: A general population-based study in xi'an of northwest china. *World J Gastroenterol* (2004) 10:1647-1651.
238. Ward, P.H., Hanson, D.G. Reflux as an etiological factor of carcinoma of the laryngopharynx. *Laryngoscope* (1988) 98:1195-1199.
239. Watanabe, Y., Fujiwara, Y., Shiba, M., Watanabe, T., Tominaga, K., Oshitani, N., Matsumoto, T., Nishikawa, H., Higuchi, K., Arakawa, T. Cigarette smoking and alcohol consumption associated with gastroesophageal reflux disease in japanese men. *Scand J Gastroenterol* (2003) 38:807-811.
240. Weber, B., Portnoy, J.E., Castellanos, A., Hawkshaw, M.J., Lurie, D., Katz, P.O., Sataloff, R.T. Efficacy of anti-reflux surgery on refractory laryngopharyngeal reflux disease in professional voice users: A pilot study. *J Voice* (2014) 28:492-500.
241. Wiener, G.J., Koufman, J.A., Wu, W.C., Cooper, J.B., Richter, J.E., Castell, D.O. Chronic hoarseness secondary to gastroesophageal reflux disease: Documentation with 24-h ambulatory ph monitoring. *Am J Gastroenterol* (1989) 84:1503-1508.
242. Wiener, G.J., Tsukashima, R., Kelly, C., Wolf, E., Schmeltzer, M., Bankert, C., Fisk, L., Vaezi, M. Oropharyngeal ph monitoring for the detection of liquid and aerosolized supraesophageal gastric reflux. *J Voice* (2009) 23:498-504.
243. Wo, J.M., Koopman, J., Harrell, S.P., Parker, K., Winstead, W., Lentsch, E. Double-blind, placebo-controlled trial with single-dose pantoprazole for laryngopharyngeal reflux. *Am J Gastroenterol* (2006) 101:1972-1978; quiz 2169.
244. Wolfe, M.M., Sachs, G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. *Gastroenterology* (2000) 118:S9-31.
245. Wright, L.E., Castell, D.O. The adverse effect of chocolate on lower esophageal sphincter pressure. *The American journal of digestive diseases* (1975) 20:703-707.
246. Xue, S., Katz, P.O., Banerjee, P., Tutuian, R., Castell, D.O. Bedtime h2 blockers improve nocturnal gastric acid control in gerd patients on proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* (2001) 15:1351-1356.
247. Yamagishi, H., Koike, T., Ohara, S., Horii, T., Kikuchi, R., Kobayashi, S., Abe, Y., Iijima, K., Imatani, A., Suzuki, K., Hishinuma, T., Goto, J., Shimosegawa, T. Stronger inhibition of gastric acid secretion by lafutidine, a novel h2 receptor antagonist, than by the proton pump inhibitor lansoprazole. *World J Gastroenterol* (2008) 14:2406-2410.
248. Ylitalo, R., Thibeault, S.L. Relationship between time of exposure of laryngopharyngeal reflux and gene expression in laryngeal fibroblasts. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (2006) 115:775-783.
249. Yorulmaz, I., Ozlucedik, S., Kucuk, B. Gastroesophageal reflux disease: Symptoms versus ph monitoring results. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2003) 129:582-586.

250. Yuksel, I., Uskudar, O., Koklu, S., Basar, O., Gultuna, S., Unverdi, S., Ozturk, Z.A., Sengul, D., Arikok, A.T., Yuksel, O., Coban, S. Inlet patch: Associations with endoscopic findings in the upper gastrointestinal system. *Scand J Gastroenterol* (2008) 43:910-914.
251. Zagari, R.M., Fuccio, L., Wallander, M.A., Johansson, S., Fiocca, R., Casanova, S., Farahmand, B.Y., Winchester, C.C., Roda, E., Bazzoli, F. Gastro-oesophageal reflux symptoms, oesophagitis and barrett's oesophagus in the general population: The loiano-monghidoro study. *Gut* (2008) 57:1354-1359.
252. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by sybr green i, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research* (2004) 32:e103.

Lebenslauf

Für die Online-Version entfernt.

Danksagung

*Wenn ich etwas tun kann,
um ein Problem zu lösen,
habe ich keinen Grund, um unglücklich zu sein.*

~

*Kann ich nichts tun,
um ein Problem zu lösen,
hilft es mir auch nicht weiter, unglücklich zu sein.*

~ Shantideva ~

Ich danke allen lieben Menschen in meinem Leben, besonders meiner Familie,
meinen Freunden und Tobias.