Einfluß der Infektion mit *Helicobacter pylori* und der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft auf histologische Veränderungen in der Schleimhaut des Magenstumpfes

The Influence of *Helicobacter pylori* Infection and of the Concentration of N-nitrosamines in the Gastric Juice on Histological Changes in the Mucosa of the Stump of the Stomach

Z. Kopański^{1,2}, J. Brandys³, P. Zastępa³, M. Schlegel-Zawadzka⁴, E. Golec¹, B. Witkowska¹, A. Cienciała¹, E. Słowakiewicz¹, Z. Kuśtra¹

Zusammenfassung: In der vorliegenden Studie wurden Kontrolluntersuchungen bei insgesamt 93 Patienten (67 Männer, 26 Frauen) durchgeführt, bei denen vor 0.5-33 Jahren eine Magenresektion nach Billroth I oder II wegen eines Ulcusleidens erfolgt war. Die Kontrolluntersuchungen umfaßten Endoskopie mit morphologischer Bewertung der entnommenen Proben, den bakteriologischen und serologischen Nachweis der Infektion mit *Helicobacter pylori* und die chromatographische Bestimmung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft. Bei der Bewertung der im Magen auftretenden histologischen Umwandlungen wurden Darmmetaplasie, Hyperplasia foveolaris und Dysplasie berücksichtigt. Es fand sich relativ häufig eine Infektion der Schleimhaut des Magenstumpfes, deren Frequenz je nach angewandeter Nachweismethode zwischen 62.4 und 69.9% lag. Die Besiedlung des Magenstumpfes mit *Helicobacter pylori* verstärkt die pathologischen Veränderungen der Schleimhaut, was sich in statistisch signifikant erhöhten Raten von Dysplasie und Darmmetaplasie zeigte. Darüber hinaus wurde die These bestätigt, daß bei Patienten mit nachgewiesener *Helicobacter pylori*-Infektion die mittlere Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft im Vergleich zu den nicht infizierten Patienten signifikant höher ist. Die größten statistisch signifikanten Differenzen zwischen der mittleren Konzentration von N-Nitrosaminen in beiden Gruppen der Patienten wurden bei der Dysplasie ($p < 0.0001$) und Darmmetaplasie ($p < 0.0001$) beobachtet. Es zeigte sich auch eine positive - jedoch nicht starke - Korre-

lation ($r = 0.69$) zwischen der Konzentrationen von IgG-Antikörpern im Serum gegen *Helicobacter pylori* und der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft.

Schlüsselwörter: *Helicobacter pylori*; Magenneoplasmen/Ätiologie; Magensaft/Analytik; Magenschleimhaut/Pathologie; Nitrosamin-Verbindungen.

Summary: Follow-up studies were performed in 93 patients (67 men and 26 women) on whom a resection of the stomach according to the method Billroth I or II had been carried out 0.5-33 years ago in the treatment of complicated ulcer disease. The studies comprised endoscopic examinations with histopathological evaluation of the biopsy specimens, microbiological and serological tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection and measurement of N-nitrosamine concentrations in gastric juice by means of a chromatographic method. In the evaluation of the histological alterations in the stomach intestinal metaplasia, epithelial hyperplasia and dysplasia were observed. Depending on the method of detection applied, an infection of the gastric mucosa was found in 62.4-69.9% of the cases. A colonization of the mucosa of the stump of the stomach was associated with a higher frequency of dysplasia and intestinal metaplasia. It was ascertained that in patients infected by *Helicobacter pylori* the mean concentration of N-nitrosamines in the gastric juice was statistically higher than in persons free of infection. Particularly clear differences in the concentration of N-nitrosamines were found between groups of patients with dysplasia ($p < 0.0001$) and intestinal metaplasia ($p < 0.0001$). Between the concentrations of IgG against *Helicobacter* in serum and the concentrations of N-nitrosamines in gastric juice a weak positive correlation ($r = 0.69$) was found.

Keywords: Gastric Juice/analysis; Gastric Mucosa/pathology; *Helicobacter pylori*; Nitroso-Compounds; Stomach Neoplasms/etiology.

¹ Chirurgische Klinik und Poliklinik (Vorstand: Oberst Doz. Dr. med. habil. A. Cienciała) des Militärkrankenhauses, Kraków, Polen

² Korrespondenzadresse: Dr. Z. Kopański, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Militärkrankenhaus, Wroclawska-Straße 3, PL-30-901 Kraków (Polen)

³ Lehrstuhl für Toxicologie der Jagiellonischen Universität, Kraków, Polen (Vorstand: Prof. Dr. habil. J. Brandys)

⁴ Lehrstuhl für Bromatologie und Ernährung der Jagiellonischen Universität, Kraków, Polen (Vorstand: Prof. Dr. habil. Z. Zachwieja)
Eingegangen am 9. Jan. 1996 / Angenommen am 3. Mai 1996

N-Nitrosamine gehören zu den in der Natur weit verbreiteten chemischen Verbindungen. In kleinen Konzentrationen treten sie u.a. in Luft, Wasser und Lebensmitteln auf, insbesondere in Fleischwaren, denen Nitrite zugesetzt wurden, sowie in einigen Fischprodukten [1-7]. Daneben ist auch die Möglichkeit der in vivo-Bildung dieser Verbindungen im Verdauungskanal bei Menschen und Tieren in Betracht zu ziehen. Die Erhöhung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft beim Menschen wird mit dem Wachstum von Bakterien, welche die Fähigkeit zur Reduktion von Nitriten und Nitraten aufweisen, in Verbindung gebracht. Derartige Bakterien treten oft im operierten Magen auf. In der neueren Literatur wird in diesem Zusammenhang auf Möglichkeit der Besiedlung des Magens mit *Helicobacter pylori* hingewiesen [8-15]. Der häufig hervorgehobene Zusammenhang zwischen der Genese eines Magenkarzinoms und der Infektion mit *Helicobacter pylori* sowie der Einwirkung der N-Nitrosoverbindungen [16-43] suggeriert die Frage nach der Korrelation zwischen der Erhöhung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft und dem Bestehen einer Infektion mit *Helicobacter pylori* sowie nach dem Einfluß dieser Faktoren auf die Entwicklung pathologischer Schleimhautveränderungen des Magens nach Resektion. Hierzu gehören Darmmetaplasie, Hyperplasia foveolaris und Dysplasie [29, 44], die im Rahmen dieser Studie histologisch erfaßt und mit labormedizinischen Befunden verglichen wurden.

Patienten und Methodik

Patientengut

In der Studie wurden insgesamt 93 Patienten im Alter von 27 bis 76 Jahren erfaßt. 67 waren männlichen, 26 weiblichen Geschlechts. Zwischen 0,5 und 33 Jahren vor den Kontrolluntersuchungen wurden 54 der Patienten einer Magenresektion mittels der Methode von Billroth I oder II unterzogen. 47 der untersuchten Patienten wurden wegen Ulcus duodeni und 46 der Patienten wegen Ulcus ventriculi operiert. Bei 74 (79,6%) der Patienten ergab sich die Indikation zum operativen Vorgehen aus einer Ulkuskrankheit und damit verbundenen Komplikationen (63 Fälle mit Entwicklung einer Stenose); bei 19 (20,4%) der Patienten bestand ein unkompliziertes Ulkus.

Untersuchungsmethoden

Die durchgeführten Kontrolluntersuchungen umfaßten u. a.:

- die Endoskopie mit der morphologischen Bewertung der entnommenen Proben aus der Schleimhaut des Magenstumpfes,

- den bakteriologischen und serologischen Nachweis der Infektion mit *Helicobacter pylori* und
- die Bestimmung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft.

Endoskopische Untersuchungen des oberen Abschnitts des Verdauungskanals

Die Methodik der endoskopischen Untersuchungen wurde in einer früheren Arbeit der Autoren [45] ausführlich vorgestellt. Von jeder Stelle, die nach einem bestimmten Plan (Abb. 1) ausgewählt wurde, wurden jeweils drei Proben entnommen: zwei Proben für die histopathologischen Untersuchungen und eine Probe für die bakteriologische Untersuchung.

Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen wurden mittels der „Paraffinmethode“ durchgeführt; die Präparate wurden serienmäßig geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (in einigen Fällen wurde eine zusätzliche Färbung angewandt). Bei der Bewertung der Magenschleimhaut wurden Darmmetaplasie, Hyperplasie foveolaris und Dysplasie unterschieden. Die Kriterien der histologischen Bewertung der Darmmetaplasie wurden nach Urban [46] und bei der Dysplasie nach Oehlert [44] angewendet; die Diagnose der Hyperplasia foveolaris wurde aufgrund der von Monroe et al. [47] angegebenen Kriterien gestellt.

Bakteriologischer und serologischer Nachweis der Infektion mit *Helicobacter pylori*

Die Methodik der Anzucht von *Helicobacter pylori* wurde in einer früheren Arbeit der Autoren [45] ausführlich vorgestellt. Zur Identifizierung der gezüchteten Mikroorganismen wurden:

- die Gramfärbung und
- die biochemischen Tests (nach dem Identifikationssystem *api Campy*, bio- Mérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) angewandt.

Die serologische Diagnostik der Antikörper der Klasse IgG im Serum gegen *Helicobacter pylori* erfolgte mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), Fa. Shimuzu Products [48]. Die Resultate wurden entsprechend den methodischen Kriterien mit „seronegativ“ (0-400 mg) oder „seropositiv“ (> 400 mg) klassifiziert.

Bestimmung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft

Die Entnahme des Untersuchungsmaterials erfolgte jeweils morgens; die Patienten hielten vor den Untersuchungen mindestens 14 Tage lang eine Diät, die das Verbot von konservierten Fleisch- und Fischprodukten umfaßte.

Die Bestimmung der N-Nitrosamine erfolgte mittels des Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen (Kontron, Zürich, Schweiz) mit Kolbenpumpe - Modell 420, Dosierventil - Rheodyne und dem spektrophotometrischen Detektor 432. Bei den Untersuchun-

Nicht standardisierte Abkürzungen: PAF, platelet-activating factor; TNF- α , tumor necrosis factor α .

gen wurden als Vergleichssubstanzen der Fa. Sigma Chemicals N-nitrosodiethanolamine, N-nitrosodimethylamine, N-nitrosomorpholine, N-nitrosodiethylamine angewandt. Die Untersuchungen wurden nach der von Lin [49] und Xu [50] angegebenen Methodik durchgeführt. Die Konzentration der N-Nitrosamine wurde in mmol/l umgerechnet.

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde mittels des Programm SAS rel. 6.03 für IBM PC durchgeführt. Die Hypothese über die Normalverteilung wurde mittels des von Shapiro-Wilk angegebenen Testes (SAS Procedures Guide, rel. 6.03) geprüft. Zur Bewertung der Signifikanz der Differenzen wurde für unabhängige Variablen der χ^2 - und der t-Test angewandt; der Zusammenhang zwischen Größen wurde durch lineare Regressionsrechnung ge-

prüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

In der Gruppe von 93 Patienten wurde *Helicobacter pylori* aus der Schleimhaut des Magenstumpfes bei 58 (62,4%) der untersuchten Patienten isoliert; bei 65 (69,9%) der Patienten wurde das Auftreten der spezifischen IgG-Antikörper gegen dieses Bakterium festgestellt. Bei allen Patienten, bei denen die Infektion mit *Helicobacter pylori* bakteriologisch bestätigt wurde, wurde ein hoher Antikörpertiter beobachtet. Bei 21 (22,6%) der untersuchten Patienten wurde eine Darmmetaplasie diagnostiziert; bei 45 (48,4%) der Patienten wurde dagegen eine Hyperplasia foveolaris festgestellt. Aus den in der Tabelle 1 zusammengestellten Untersu-

Abbildung 1 Lokalisation der Probeexzisionen. 1 Gegend der Anastomose (kleine Krümmung); 2 und 3 Magenkörper (kleine Krümmung); 4 Gegend der Anastomose (große Krümmung); 5 Magenkörper (große Krümmung); 6 Gegend der Anastomose (Vorderwand); 7 Gegend der Anastomose (Hinterwand); 8 und 10 Magenkörper (Vorderwand); 9 und 11 Magenkörper (Hinterwand)

chungsergebnissen geht hervor, daß sowohl die Dysplasie als auch die Darmmetaplasie häufiger bei Patienten auftrat ($p > 0,05$), die mit *Helicobacter pylori* infiziert waren; demgegenüber wurde die Hyperplasia foveolaris häufiger bei Patienten beobachtet, die mit diesem Bakterium nicht infiziert waren.

Die Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft bei allen untersuchten Patienten lag im Intervall von 0,002 bis 1,5 mmol/l (Mittelwert: $0,291 \pm 0,086$ mmol/l). Aus den in der Tabelle 1 dargestellten Daten ergibt sich, daß die mittlere Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft bei Patienten, bei denen die Infektion mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen wurde, im Vergleich zur Gruppe der nicht infizierten Patienten statistisch signifikant ($p < 0,0001$) größer war. Besonders große Unterschiede der mittleren Konzentrationen von N-Nitrosaminen in beiden Gruppen der Patienten beobachtet man bei der Dys-

plasie ($p < 0,0001$) und der Darmmetaplasie ($p < 0,0001$). Darüber hinaus konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration von N-Nitrosaminen und der Infektion mit *Helicobacter pylori* bei der Hyperplasia foveolaris im Magensumpf gefunden werden.

Die Bestimmung des Titors der IgG-Antikörper gegen *Helicobacter pylori* im Serum und der Konzentration der N-Nitrosamine im Magensaft bei allen untersuchten Patienten ermöglichte auch die Anwendung der Regressionsanalyse zur Feststellung einer Korrelation zwischen den beiden Größen (Abb. 2). Es fand sich eine positive Korrelation, d. h. einer Zunahme des Titors der IgG-Antikörper gegen *Helicobacter pylori* im Serum entspricht eine Erhöhung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft. Der relativ niedrige Wert des Korrelationskoeffizienten ($r = 0,691$) bedeutet, daß diese Korrelation für ca. 30% der Fälle nicht gilt.

Abbildung 2 Zusammenhang zwischen der Konzentration von Antikörpern (IgG) gegen *Helicobacter pylori* im Serum und der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft ($y = 0,17x + 56,4$; $r = 0,691$)

Tabelle 1 Umwandlungen der Schleimhaut des Magenstumpfes bei Patienten mit und ohne Infektion mit *Helicobacter pylori* und gemessene Konzentrationen von N-Nitrosaminen im Magensaft

Histologische Veränderung	Positiver Nachweis einer h. p. Infektion				Kein Nachweis einer h. p. Infektion			
	Zahl der Untersuchten			N-Nitrosamine ¹ (mmol/l)	Zahl der Untersuchten			N-Nitrosamine ¹ (mmol/l)
	insgesamt	mit Umwandlung	%		insgesamt	mit Umwandlung	%	
Dysplasie	58	15	25,9	0,398* (0,239)	35	6	17,1	0,163* (0,071)
Darmmetaplasie	58	30	51,7	0,317* (0,186)	35	15	42,9	0,149* (0,063)
Hyperplasie foveolaris	58	22	37,9	0,148 (0,073)	35	16	45,7	0,135* (0,052)

* Statistisch signifikante Differenzen zwischen den Gruppen mit und ohne *Helicobacter pylori* (h.p.)-Infektion¹ Mittelwerte (Standardabweichungen)

Diskussion

Das Problem der Bildung eines Karzinoms im Magenstumpf nach der Teilresektion des Magens wegen der Ulkuskrankheit wird seit über 70 Jahren untersucht [51], jedoch sind die Zusammenhänge bisher immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Rolle spielen hier vermutlich die Umwandlungen der Schleimhaut des Magenstumpfes. Bei Patienten mit Zustand nach Teilresektion des Magens werden nämlich Darmmetaplasie, Hyperplasie foveolaris und Dysplasie häufiger beobachtet als in der gesamten Population. Viele Arbeitsgruppen berichten, daß das Auftreten dieser Veränderungen die erhöhte Gefahr der Karzinomentstehung signalisieren kann [22, 26, 29, 52-54]. Diese morphologischen Umwandlungen hängen jedoch von vielen Faktoren ab. Eine bedeutende Rolle bei der histologischen Umwandlung der Magenschleimhaut spielt auch die Bakterienflora dieses Abschnitts des Verdauungskanal. Im nicht operierten Magen treten hauptsächlich grampositive Bakterien (*Streptococcus*, *Lactobacillus*), Pilze (*Candida albicans*) und einige Anaerobier (*Fusobacterium*, *Veillonella*, *Bacterioides oralis*) mit einer Konzentration von $2.5 \cdot 10^3$ /ml auf. Nach Resektionseingriffen nimmt die Konzentration von Bakterien stark zu und erreicht sogar den Wert von 10^6 - 10^7 /ml. Aus dem Magensaft werden häufig *Escherichia coli* und *Streptococcus* (*Enterococcus*) isoliert [10, 11, 55]. Unsere Untersuchungen bestätigten, daß in der reichen Bakterienflora des operierten Magens *Helicobacter pylori* sehr oft auftritt. Dieser Mikroorganismus wurde aus der Schleimhaut des Magenstumpfes bei 62,4% der Patienten isoliert; die Präsenz der IgG gegen dieses Bakterium im Serum wurde bei 69,9% der Patienten festgestellt. Die Besiedlung des Magenstumpfes mit *Helicobacter pylori* verstärkt die pathologischen Schleimhautveränderungen. Aus den durchgeführten Untersuchungen ergab sich nämlich, daß die Dysplasie und die Darmmetaplasie bei den Patienten häufiger auftritt, bei denen die Infektion mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen wurde; die Hyperplasie foveolaris trat dagegen etwas häufiger bei Patienten auf, die mit diesem Bakterium nicht infiziert waren.

Die pathogene Einwirkung von *Helicobacter pylori* auf die Magenschleimhaut kann mit der Produktion verschiedener mikrobieller Toxine und Enzyme, mit der Freisetzung von TNF- α , Interleukin-1, -6, -8, PAF, Stickstoffmonoxid (NO) und von freien Sauerstoffradikalen in Verbindung gebracht werden [13, 56-63]. In einigen Publikationen wird auch die Möglichkeit der Einwirkung von *Helicobacter pylori* auf die Magenschleimheit durch die Erhöhung der Konzentration von N-Nitrosoverbindungen im Magensaft unterstrichen [36]. Der Mechanismus dieses Phänomens wird mit der Freisetzung von Oxygenasen aus den zerfallenden Epithelzellen und Makrophagen - infolge der Einwirkung von *Helicobacter pylori* - in Verbindung gebracht. Die Enzyme sind vermutlich für die Aktivierung von Prokanzerogenen und für die Bildung der N-Nitrosamine im Magen verantwortlich. Unsere Untersuchungen zeigen statistisch signifikant höhere Mittelwerte der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft bei Patienten, bei denen die Infektion mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen wurde. Die größten statistisch signifikanten Differenzen zwischen den mittleren Konzentrationen von N-Nitrosaminen in beiden Patientengruppen wurden bei Dysplasie ($p < 0,0001$) und bei Darmmetaplasie ($p < 0,0001$) beobachtet. Die durchgeführten Untersuchungen haben darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von IgG-Antikörpern gegen *Helicobacter pylori* und der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft bestätigt.

bacter pylori im Serum und der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft nachgewiesen.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigten die These, daß die morphologische Umwandlung der Schleimhaut der Magenstumpfes mit mehreren Faktoren, darunter auch mit einer Infektion mit *Helicobacter pylori*, in Verbindung gebracht werden kann: die vermutliche Rolle dieses Bakteriums für die Karzinogenese im Magen kann mit der Erhöhung der Konzentration von N-Nitrosaminen im Magensaft in Zusammenhang gebracht werden.

Literatur

1. Baker JK, Ma CY. Determination of N-nitrosoproline in meat samples. *J Agric Food Chem* 1978;26:1253-5.
2. Digenis GA, Issidorides CH. Some biochemical aspects of N-nitroso compounds. *Bioorg Chem* 1979;8:97-137.
3. Fishbein L. Overview of some aspects of occurrence, formation, and analysis of nitrosamines. *Sci Total Environ* 1979;13:157-188.
4. Gatehouse DG, Tweats DJ. Mutagen formation after the addition of nitrate to normal human gastric juice. *Carcinogenesis* 1982;3:597-8.
5. Shephard SE, Lutz WK. Nitrosation of dietary precursors. In: Forman D, Shuker D, editors. *Cancer Surveys 8. TOWN(COUNTRY):PUBLISHER*, 1989:401-21.
6. Walters CL. Analytical problems in the determination of N-nitroso compounds in gastric juice. In: Reed PI, Carboli M, Johnston BJ, Guadagni S, editors. *New trends in gastric cancer: background and videography*. Dordrecht (The Netherlands) Kluwer Academic Publishers, 1990:31-7.
7. Xu GP, Song PJ, Reed PI. The relationship between gastric mucosal changes and nitrate intake via drinking water in a high-risk population for gastric cancer in Mopiong Country, China. *Eur J Cancer Prev* 1992;1:437-43.
8. Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 1985;6:911-5.
9. Calmels S, Ohshima H, Bartsch H. Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J Gen Microbiol* 1988;134:221-6.
10. O'Donnell CM, Edwards C, Corcoran GD, Ware J, Edwards PR. In vitro production of nitrosamines by bacteria isolated from the operated stomach. In: Bartsch H, O'Neill IK, Schulte-Hermann R, editors. *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer. Exposures and mechanisms*. Lyon(France):IARC Sci Publ, 1987:400-3.
11. Gorbach SL, Levitan R. Intestinal flora in health and in gastrointestinal diseases. *Progress of Gastroenterology*, Vol II. New York (USA):GBJ Glass Grune-Stratton, 1970.
12. Leach SA, Cook AR, Challis BC, Hill MJ, Thompson MH. Bacterially mediated N-nitrosation reactions and endogenous formation of N-nitroso compounds. In: Bartsch H, O'Neill IK, Schulte-Hermann R, editors. *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer. Exposures and mechanisms*. Lyon(France):IARC Sci Publ No 84, 1987:396-9.
13. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988;26:93-9.
14. Suzuki K, Mitsuoka T. N-nitrosamine formation by intestinal bacteria. Lyon (France) IARC Sci Publ No 57, 1984:275-81.
15. Watt PC, Sloan JM, Donaldson JD, Patterson CC, Kennedy TL. Relationship between histology and gastric juice pH and nitrite in the stomach after operation for duodenal ulcer. *Gut* 1984;25:246-52.
16. Aukee S, Krohn K. Occurrence and progression of gastritis in patients operated on for peptic ulcer. *Scand J Gastroenterol* 1972;7:541-46.
17. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. Endogenously formed N-nitroso compounds and nitrosating agents in human cancer etiology. *Pharmacogenetics* 1992;2:272-7.
18. Charnley G, Tannenbaum SR, Correa P. Gastric cancer: an etiological model. In: Magee PN, editor. *Nitrosamines and human cancer*, Banbury Report 12. Cold Spring Harbor, NY (USA):CSH Press, 1982:503-22.
19. Crespi M, Ohshima H, Ramazzotti V. Intra-gastric nitrosation and precancerous lesions of the gastrointestinal tract: testing of an etiological hypothesis. In: Bartsch H, O'Neill IK, Schulte-Hermann R, editors. *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer. Exposures and mechanisms*. Lyon (France): IARC Sci Publ No 84, 1987:511-17.
20. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988;48:3554-60.
21. Domellöf L, Eriksson S, Janunger KG. Late precancerous changes and carcinoma of the gastric stump after Billroth I resection. *Am J Surg* 1976;132:26-31.
22. Domellöf L, Eriksson S, Janunger KG. Carcinoma and possible precancerous changes of the gastric stump after Billroth II resection. *Gastroenterology* 1977;73:462-8.
23. Forman D. The aetiology of gastric cancer. In: O'Neill IK, Chen J, Bartsch H, editors. *The relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. Lyon (France): IARC Sci Publ No 105, 1991:22-32.
24. Forman D. *Helicobacter pylori* infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 83, 1991:23:1702-3.
25. Forman D, Al-Dabbagh S, Knight T, Doll R. Nitrate exposure and the carcinogenic process. *Ann NY Acad Sci* 1988;534:597-603.
26. Glass GBJ, Pitchumoni CS. Atrophic gastritis. *Hum Pathol* 1975;6:219-50.
27. Hall CN, Darkin D, Brimblecombe R, Cook AJ, et al. Evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. *Gut* 1986;27:491-498.
28. Helsing N, Hillestad L. Cancer development in the gastric stump after partial gastrectomy for ulcer. *Ann Surg* 1956;143:173-79.
29. Hermanek P. Gastric carcinoma - precancerous conditions and lesions, classification, and prognosis. In: Hotz J, Meyer HJ, Schmoll HJ, editors. *Gastric carcinoma*. Heidelberg (Germany): Springer, 1989:17-31.
30. Houghton PWJ, Leach S, Owen RW, Mac Mortensen NJ, et al. Use of a modified N-nitrosoproline test to show intra-gastric nitrosation in patients at risk of gastric cancer. *Br J Cancer* 1989;60:231-4.
31. Magee PN, Montesano R, Preussmann R. N-nitroso compounds and related carcinogens. In: Searle CE, editor. *Chemical carcinogens*. ACS Monograph 173. Washington (DC): American Chemical Society, 1976:491-27.
32. Nomura A, Stemmermann GN. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:294-303.
33. Odashima S. Overview: N-nitroso compounds as carcinogens for experimental animals and man. *Oncology* 1980;37:282-286.
34. Olajos EJ. Biological interactions of N-nitroso compounds. *Ecotoxicol Environ Safety* 1977;1:175-196.
35. Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;22:89-104.
36. Pignatelli B, Malareille C, Rogatko A, Hautefeuille A, et al. Mutagens, N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesions of the stomach. *Eur J Cancer* 1993;14:2031-9.
37. Robles-Campos R, Lujan-Mompean JA, Parrilla-Paricio P, Bermejo-Lopez J, et al. Role of *Helicobacter pylori* infection and duodenogastric reflux in the pathogenesis of alkaline reflux gastritis after gastric operations. *Surg Gynecol Obstet* 1993;176:594-8.
38. Sipponen P, Hyvarinen H. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 1993;196:3-6.
39. Sobala GM, Pignatelli B, Schorah CJ, Bartsch H, et al. Levels of nitrite, nitrate, N-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of the stomach. *Carcinogenesis* 1991;12:193-8.
40. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Nagano K, et al. Ammonia: a possible promoter in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 1992;65:15-18.

41. Wee A, Kang JY, Teh M. *Helicobacter pylori* and gastritis cancer: correlation with gastritis, intestinal metaplasia, and tumour histology. *Gut* 1992;33:1029-32.
42. Xu GP, Song PJ. Determination of nitrate, nitrite in drinking water of inhabitants from a high-risk area for gastric cancer. *Chinese J Food Hygiene* 1990;2:25-8.
43. Xu GP, Song PJ. Occurrence of volatile N-nitrosamines in gastric juice of the subjects from a high-risk area for gastric cancer and its relationship to intragastric lesions. *Tumour* 1990;10:264-8.
44. Oehlert W. Biological significance of dysplasias of the epithelium and of atrophic gastritis. In: Herfarth C, Schlag P, editors. *Gastric cancer*. Berlin (Germany): Springer, 1979: 91-104.
45. Kopański Z, Cienciała A, Banaś J, Kamiński B, Witkowska B, Zastępa P, Brandys J, Micherdziński. Koexistenz der Infektion der Mundhöhle sowie der Magen- und Duodenalschleimhaut mit *Helicobacter pylori* bei Patienten mit Ulkuskrankheit und chronischer Gastritis. *Wien Klin Wochenschr* 1995; 107/7:219-24.
46. Urban A (1993) Patologia przewodu pokarmowego. In: Groniewski J, Kruś S, editors. *Podstawy patomorfologii*. Warszawa (Polen): PZWL, 1993:558-639.
47. Monroe LS, Boughton GA, Sommers SC. The association of gastric epithelial hyperplasia and cancer. *Gastroenterology* 1964;46:267-73.
48. Kopański Z, Cienciała A. Serologischer Nachweis von *Helicobacter pylori*-Antikörpern nach Operationen wegen *Ulcus ventriculi* und *Ulcus duodeni*. *Wien Klin Wochenschr* 1993;105/14:408-411.
49. Lim LK, Li SFY, Lee MK. Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of nitrosamines: the use of the overlapping resolution mapping technique for the optimization of solvent compositions. *Chromatographia*, 1993;9-12:671-4.
50. Xu GP, Reed PI. Method for group determination of total N-nitroso compounds and nitrite in fresh gastric juice by chemical denitrosation and thermal energy analysis. *Analyst* 1993;18:877-83.
51. Balfour DC. Factors influencing the life expectancy of patients operated on for gastric ulcer. *Ann Surg* 1922;76:405-8.
52. Correa P. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer* 50 [Suppl] 1982;1:2554-65.
53. Cheli R, Giacosa A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy - one and same. *Gastrointest End* 1983;29:23-25.
54. Cheli R, Giacosa A. Atrophic gastritis. In: Scherlock P, Morson BC, Barbara L, Veronesi U, editors. *Precancerous lesions of the gastrointestinal tract*. New York (USA): Raven, 1983:33-110.
55. Hill MJ (1986) Cancer of the stomach. In: Hill MJ, editors. *Microbes and human carcinogenesis*. London (UK) Edward Arnold, 1986:36-55.
56. Bode G, Malfertheiner P, Stroble A, Mauch F, Ditschuneit H. Polymorphism in *Helicobacter pylori* a key function in recurrence of infection? *Med Klin* 15, 87, 1992;4:179-84.
57. Farinati F, Cardin R, Libera D, Rugge M, Di Mario F. Lipid peroxidation and anti-oxidant defence in human gastric mucosa: effect of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5 [Suppl] 1993;2:9-11.
58. Ferrero RL, Hazell SL, Lee A. The urease enzymes of *Campylobacter pylori* and related bacterium. *J Med Microbiol* 1988;27:33-40.
59. Figura N. Role of cytotoxin in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5 [Suppl] 1993;2:16-8.
60. Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adoption to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986;153:658-63.
61. Jakóbsiak M. *Immunologia*. Warszawa (Poland): PZWL, 1993.
62. Korman MG, Marks IN, Hunt RH, Axont A. et al. *Helicobacter pylori*: a workshop review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993;11:963-7.
63. De Koster E. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 5 [Suppl] 1993;2:33-35.