

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Rasterelektronenmikroskopie

#### 4.1.1 Dokumentation der Einzelbefunde

In der Dokumentation der Einzelbefunde werden die verschiedenen Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen demonstriert und anhand von Beispielen erklärt. Neben intakten Mesothelzellen, Tumorzellen und Erythrozyten zeigen die Einzelbefunde auch typische Veränderungen des Peritoneums auf äußere Reize wie Separation und Retraktion der Mesothelzellen. Demonstriert werden aber auch Artefakte und andere Auffälligkeiten, die bei der Elektronenmikroskopie entdeckt wurden.

#### **Intaktes Mesothel**

Die Abbildung 3 stammt vom Peritoneum eines Kontrolltieres und zeigt einen Normalbefund. Die peritoneale Oberfläche ist von einer Schicht flacher Mesothelzellen bedeckt. Die Deckzellen besitzen eine unregelmäßige, polygonalen Umriss und messen im Durchmesser ca. 12 – 27  $\mu\text{m}$ . Auf ihrer Oberfläche findet sich ein Teppich aus feinen Mikrovilli. Die Zellgrenzen sind als Rinnen angedeutet, an denen die Dichte der Mikrovilli zunimmt. Eine genaue Bestimmung der Grenzen gelingt nur durch genaue Untersuchung mit hoher Vergrößerung. Die Basalmembran ist an keiner Stelle sichtbar, Entzündungszellen oder Fibrinbeläge sind nicht auszumachen.

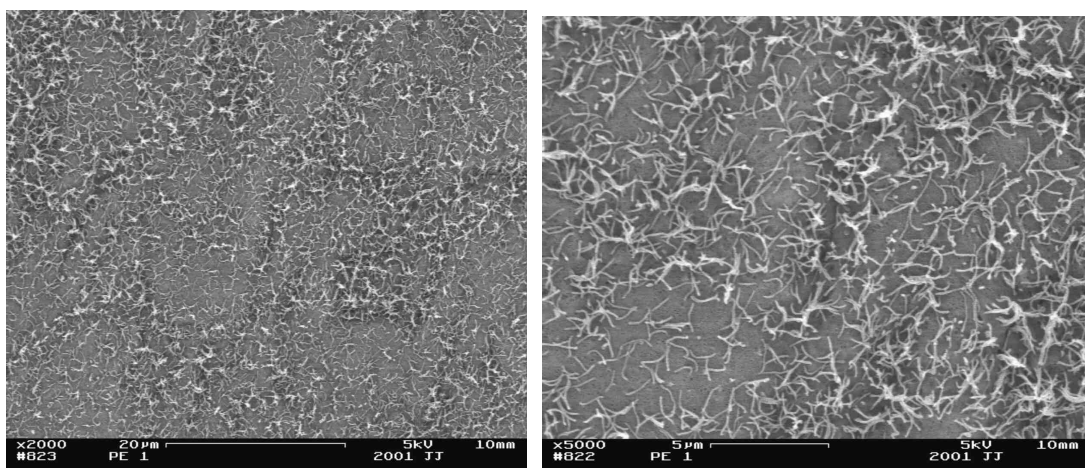


Abb. 3: 2000 - bis 5000 -fache Vergrößerung

## Tumorzellen

Die Tumorzellen präsentieren sich zum größten Teil als Rundzellen (Abbildung 4). Einige der malignen Zellen befinden sich gerade in Mitose. Die Oberflächenstruktur der malignen Zellen ist vielgestaltig. Es kommen kurze Mikrovilli, Auffältelungen, Einbuchtungen und unterschiedliche Ausstülpungen der Zellmembran vor. Die Durchmesser betragen zwischen 5 und 8,5  $\mu\text{m}$ .

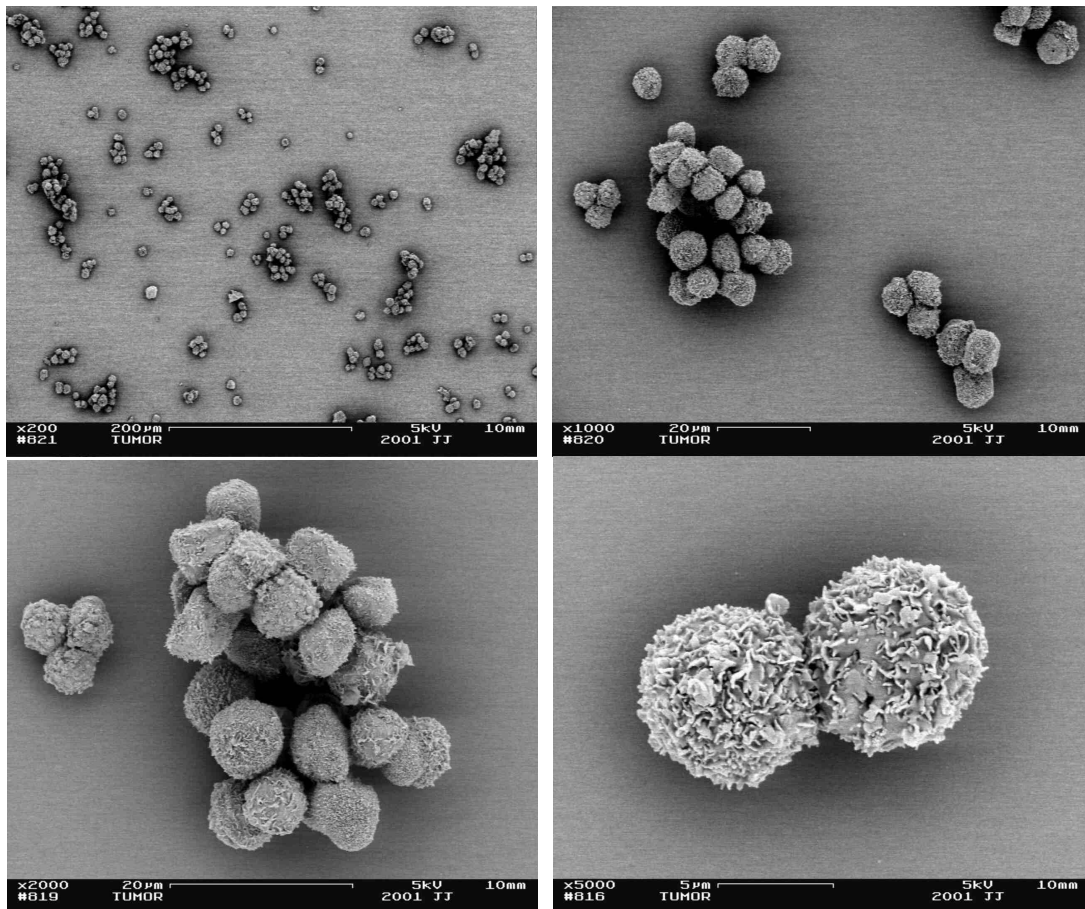


Abb. 4: 200 - bis 5000 -fache Vergrößerung

## Separation der Mesothelzellen

Abbildung 5 zeigt die Separation von Deckzellen mit Erhalt von Interzellularbrücken. Das gezeigte Biopsat wurde zwölf Stunden nach Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid gewonnen. Die Mesothelzellen behalten ihre flache, polygonale Form, ihr apikaler Zellpol erscheint dagegen leicht kontrahiert. Zellgrenzen sind eindeutig erkennbar. Die Zellen sind auseinandergewichen und es entstehen scheinbar Spalten zwischen den Mesothelzellen. Dabei wird die Verbindung zwischen den Zellen immer durch Interzellularbrücken aufrechterhalten. Eine vollständige Separation konnte in keinem Präparat dokumentiert werden. Form und Anzahl der Mikrovilli sind unbeeinträchtigt. Fibrinbeläge oder Entzündungszellen lassen sich nicht nachweisen.

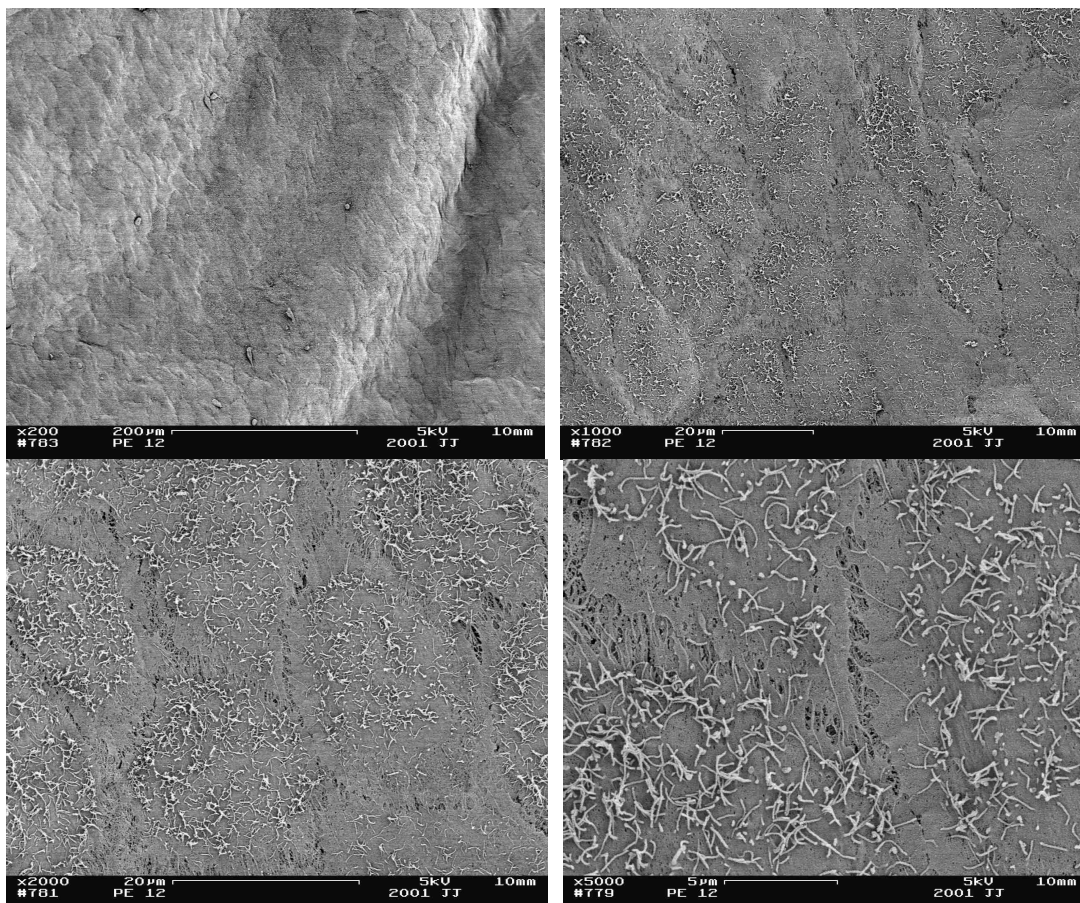


Abb.5: 200 - bis 5000 -fache Vergrößerung

## Retraktion der Mesothelzellen

Die Abbildung 6 demonstriert die Retraktion von Mesothelzellen. Das Präparat wurde einer Ratte 96 Stunden nach Applikation des Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid entnommen. Die Mesothelzellen zeigen eine Retraktion des apikalen Zellpols. Sie besitzen eine abgerundete Form und sind deutlich durch Furchen voneinander abgrenzbar. Die teilweise ineinandergreifenden Zellgrenzen sind als Linien zwischen den Zellen gut erkennbar. Die Mikrovilli offenbaren keine Deformation im Sinne einer Verkürzung oder Verplumpung. Fibrinbeläge oder Entzündungszellen lassen sich nicht nachweisen.

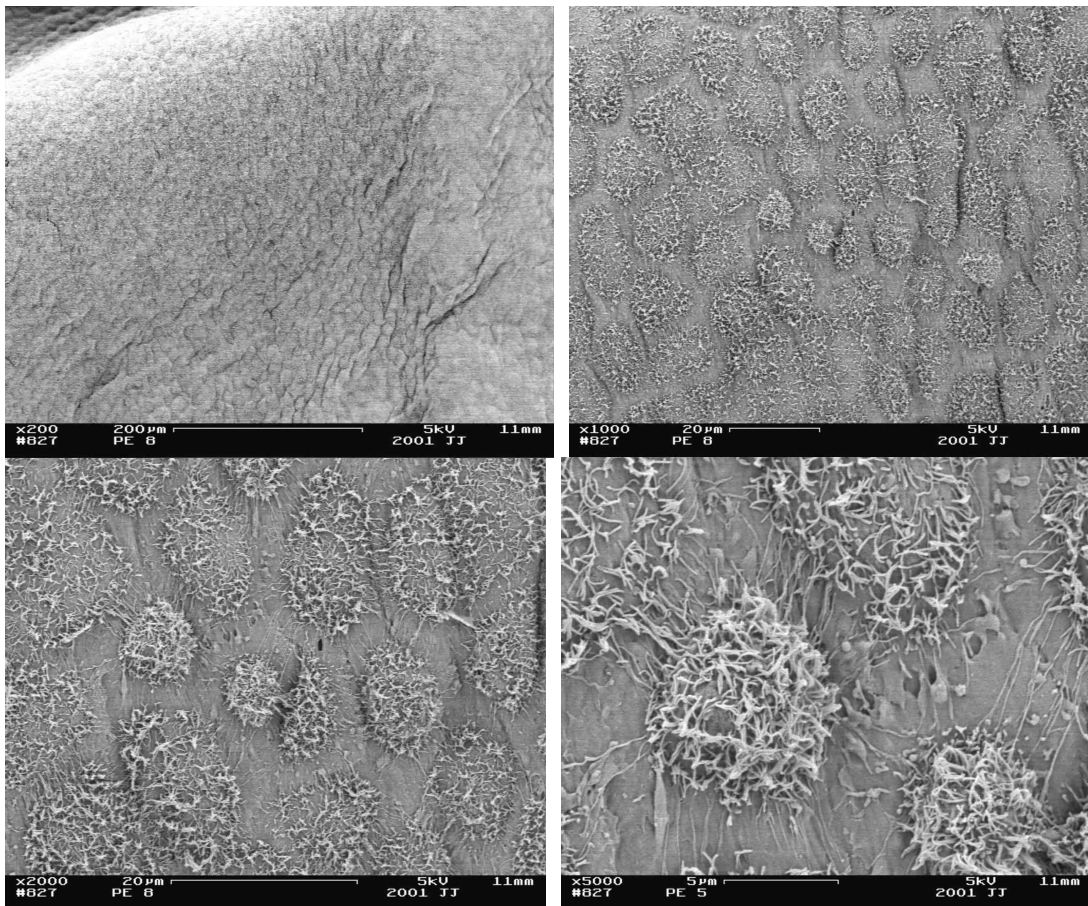


Abb. 6: 200 - bis 5000 -fache Vergrößerung

### Mechanisch verursachte Läsion des Peritoneums

Anhand einer Probe eines Kontrolltieres konnte eine offensichtlich mechanische Läsion dokumentiert werden (Abbildung 7). Sie besitzt die Form von zwei parallelen, ca 5 mm langen und ca. 6 – 8  $\mu\text{m}$  breiten Streifen, welche das sonst intakte Peritoneum durchziehen. Die Deckzellen sind abgelöst, die Basalmembran entblößt. Es liegen keine Veränderungen des umliegenden Mesothels vor. Fibrinbeläge, Tumor- oder Entzündungszellen lassen sich ebenfalls nicht nachweisen.

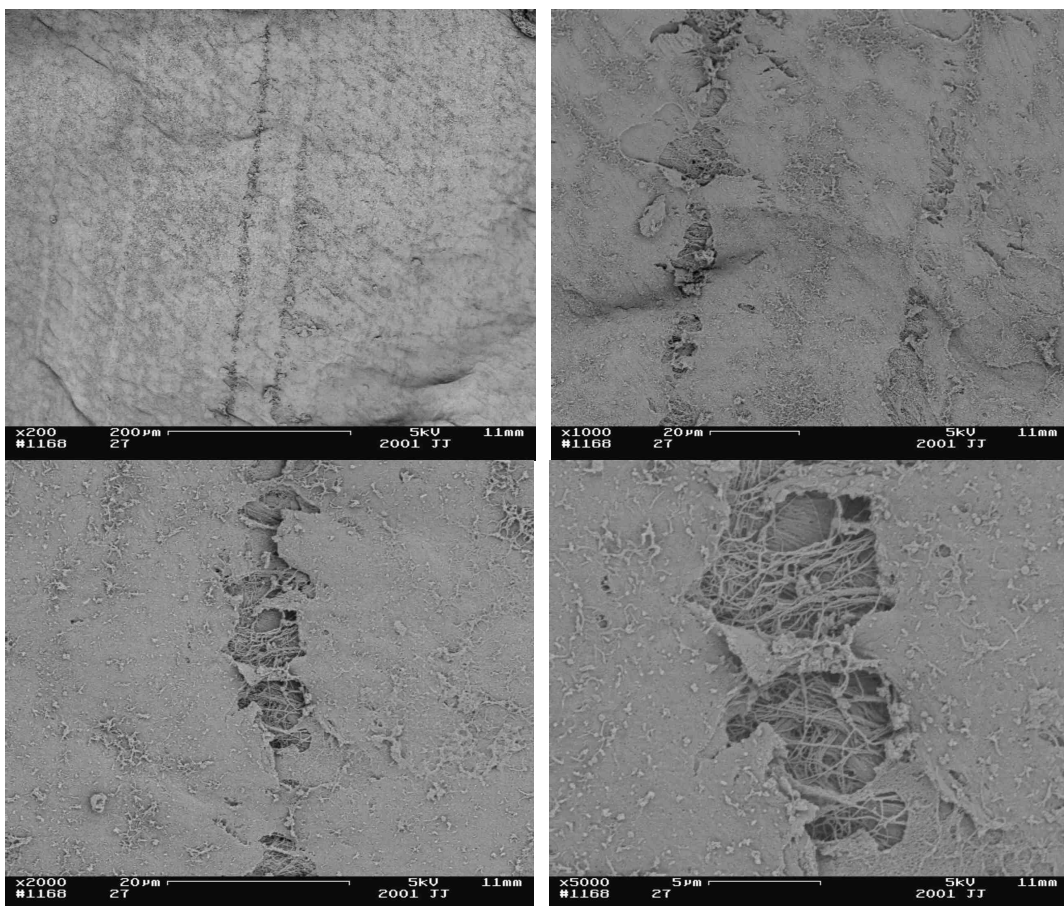


Abb. 7: 200 - bis 5000 -fache Vergrößerung

## Erythrozyten

Auf dem Mesothel liegende Erythrozyten sind leicht an ihrer Form und Größe zu erkennen. Sie treten einzeln oder als Zellballen auf (Abbildung 8). Stets zeigten die Erythrozyten ein gleichmäßiges Verteilungsmuster auf der Oberfläche des Peritoneums.

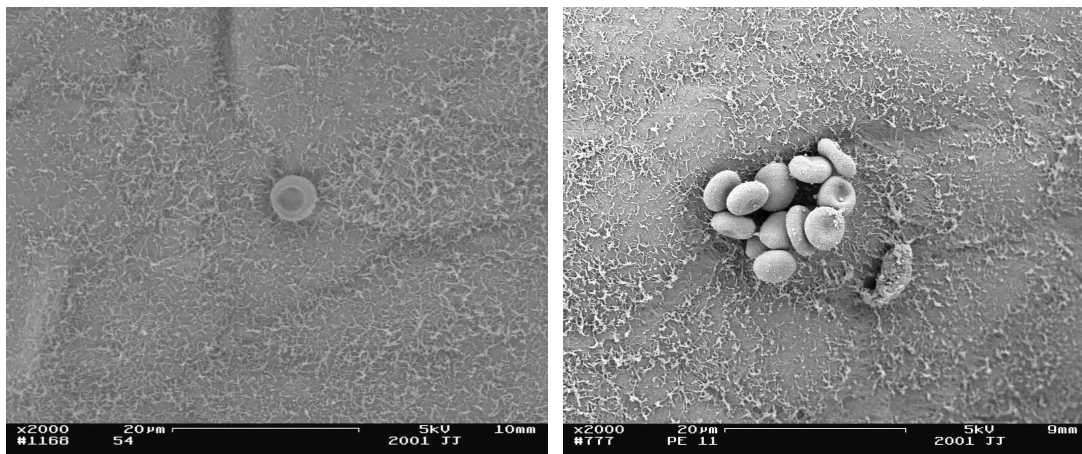


Abb. 8: 2000-fache Vergrößerung

## Risse in der Oberfläche

In einigen Proben war das Mesothel von Rissen durchzogen. Die Risse waren bis zu 5 µm breit und 150 µm lang. Die Risse folgten nicht den Zellgrenzen und entblößten nicht die Basalmembran, sondern bildeten schluchtenartige, in die Tiefe ziehende Eröffnungen der peritonealen Oberfläche. Das Auftreten von Rissen war immer lokal begrenzt und wurde als Artefakt gewertet.

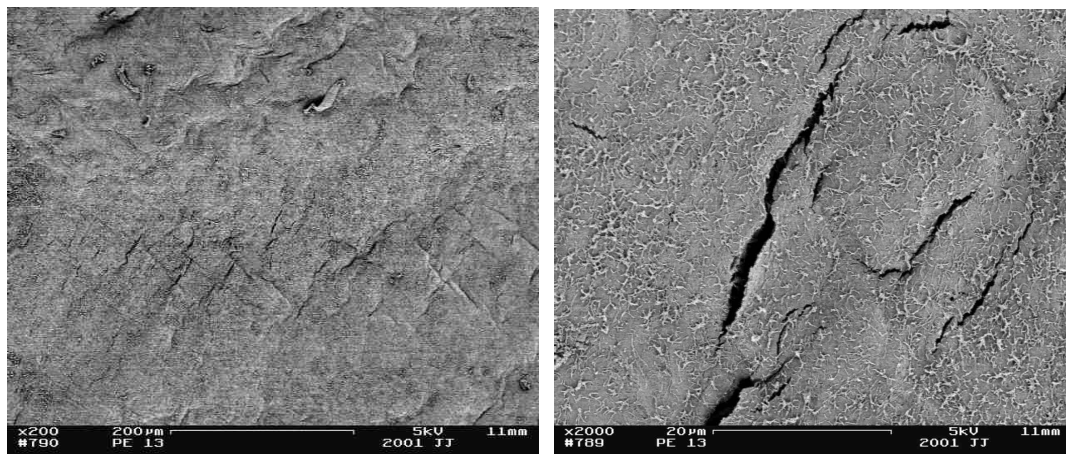


Abb. 9: 200 - bis 2000 -fache Vergrößerung

## Feinkörnige Beläge

Stellenweise sind die Mesothelzellen von feinkörnigen Belägen bedeckt (Abbildung 10). Diese verkleben die Mikrovilli und erschweren die Beurteilung des Peritoneums. Sie variieren zum Teil in ihrer Dichte und ihr Auftreten ist unabhängig von anderen entzündlichen Veränderungen.

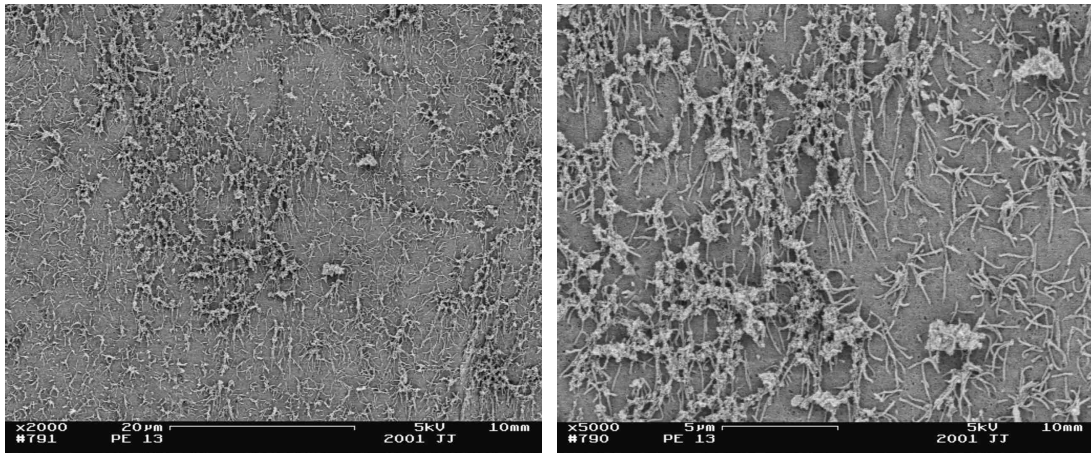


Abb. 10: 2000 - bis 5000 -fache Vergrößerung

### 4.1.2 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Das Peritoneum aller Kontrolltiere war intakt. Als Besonderheit fand sich in einem Präparat eine offensichtlich mechanisch verursachte Läsion. In zwei Proben wurden Rundzellen entdeckt.

	Diagnose	Befunde
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	Streifenförmige mechanische Läsion
3	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge in zwei Quadranten
4	Intaktes Mesothel	
5	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten

Tabelle5: Auswertung der Kontrolltiere

### 4.1.3 Ergebnisse der Kohlendioxidgruppe

Von den 25 untersuchten Ratten kann bei 21 Tieren keine Veränderungen des Peritoneums im Sinne einer Entzündung oder Reizung festgestellt werden (84%). Viermal wird eine Reizung des Mesothels diagnostiziert (16%); in keiner Untergruppe ist die Häufigkeit einer Reizung größer als zwei. Rundzellen treten in sechs Präparaten auf, Erythrozyten in drei Präparaten.

Im folgenden sind die einzelnen Proben in Abhängigkeit von den Entnahmezeitpunkten tabellarisch dargestellt:

	Diagnose	Befunde
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Belege, Erythrozyten in allen Quadranten
3	Intaktes Mesothel	
4	Intaktes Mesothel	
5	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten

Tabelle6: Auswertung der Untergruppe CO<sub>2</sub>/2, Biopsieentnahme nach **zwei Stunden**

	Diagnose	Befunde
1	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
2	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten
3	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
4	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt von Interzellularbrücken in allen Quadranten
5	Intaktes Mesothel	

Tabelle7: Auswertung der Untergruppe CO<sub>2</sub>/12, Biopsieentnahme nach **zwölf Stunden**



	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten, lokale Alteration des Mesothels
2	Intaktes Mesothel	Risse in zwei Quadranten
3	Intaktes Mesothel	
4	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt von Interzellularbrücken , lokale Alteration
5	Intaktes Mesothel	

Tabelle8: Auswertung der Untergruppe CO<sub>2</sub>/24, Biopsieentnahme nach **24 Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten
3	Intaktes Mesothel	
4	Intaktes Mesothel	Rundzellen in zwei Quadranten
5	Intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt der Interzellularbrücken in einem Quadranten

Tabelle9: Auswertung der Untergruppe CO<sub>2</sub>/48, Biopsieentnahme nach **48 Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Retraktion der Deckzellen in zwei Quadranten
2	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt von Interzellularbrücken in allen Quadranten
3	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten in allen Quadranten
4	Intaktes Mesothel	
5	Intaktes Mesothel	

Tabelle10: Auswertung der Untergruppe CO<sub>2</sub>/96, Biopsieentnahme nach **96 Stunden**

#### 4.1.4 Ergebnisse der Heliumgruppe

Von den 25 untersuchten Präparaten kann in 21 Fällen ein intaktes Peritoneums diagnostiziert werden (84%). Vier mal wird eine Veränderung des Peritoneums mit Separation und Retraktion der Mesothelzellen diagnostiziert (16%). Rundzellen treten in fünf Präparaten auf, Erythrozyten in vier Präparaten.

Im folgenden sind die einzelnen Proben in Abhängigkeit von den Entnahmezeitpunkten tabellarisch dargestellt:

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Retraktion des Mesothels in drei Quadranten, lokale Alteration mit Fibrinfäden
2	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten in allen Quadranten
3	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Retraktion von Mesothelzellen in zwei Quadranten
4	Intaktes Mesothel	Rundzellen und einzelne Risse in einem Quadranten
5	Intaktes Mesothel	Einzelne Rundzellen in zwei Quadranten

Tabelle11: Auswertung der Untergruppe Helium/2, Biopsieentnahme nach **zwei Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
2	Intaktes Mesothel	Einzelne Erythrozyten
3	Intaktes Mesothel	Rundzellen in einem Quadranten
4	Intaktes Mesothel	
5	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt der Interzellularbrücken in zwei Quadranten

Tabelle12: Auswertung der Untergruppe Helium/12, Biopsieentnahme nach **zwölf Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	Risse in zwei Quadranten
3	Intaktes Mesothel	
4	<b>Nicht</b> intaktes Mesothel	Separation mit Erhalt von Interzellularbrücken in allen Quadranten
5	Intaktes Mesothel	

Tabelle13: Auswertung der Untergruppe Helium/24, Biopsieentnahme nach **24 Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	
3	Intaktes Mesothel	
4	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge in zwei Quadranten Rundzellen in einem Quadranten
5	Intaktes Mesothel	

Tabelle14: Auswertung der Untergruppe Helium/48, Biopsieentnahme nach **48 Stunden**

	<b>Diagnose</b>	<b>Befunde</b>
1	Intaktes Mesothel	
2	Intaktes Mesothel	
3	Intaktes Mesothel	Risse in einem Quadranten
4	Intaktes Mesothel	Erythrozyten in allen Quadranten
5	Intaktes Mesothel	Feinkörnige Beläge und einzelne Erythrozyten in einem Quadranten

Tabelle15: Auswertung der Untergruppe Helium/96, Biopsieentnahme nach **96 Stunden**

#### **4.1.5 Statistische Auswertung**

Das Pneumoperitoneum mit den Insufflationsgasen Kohlendioxid oder Helium führt insgesamt nur bei vier Tieren in jeder Hauptgruppe zu morphologisch Veränderung des Peritoneums. Die Häufigkeit der Diagnose „nicht intaktes Peritoneum“ ist jedoch in keiner Untergruppe größer als zwei. Somit besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Zwischen der Kohlendioxid- und der Helium-Gruppe kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## 4.2 Adhäsionsmolekülexpression auf HT-29-Zellen

Durchflusszytometrische Darstellung von HT-29 Kolonkarzinomzellen in Ihrer relativen Größe und ihrer relativen Granularität (sogenanntes Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht). Innerhalb der markierten Region R1 befinden sich die zu untersuchenden Zellen. Außerhalb von R1 liegende Zellen stellen Zelltrümmer dar, die für die Expressionsanalyse nicht berücksichtigt werden. Diese Abbildung ist ein repräsentatives Beispiel für die unterschiedlichen Inkubationsexperimente.

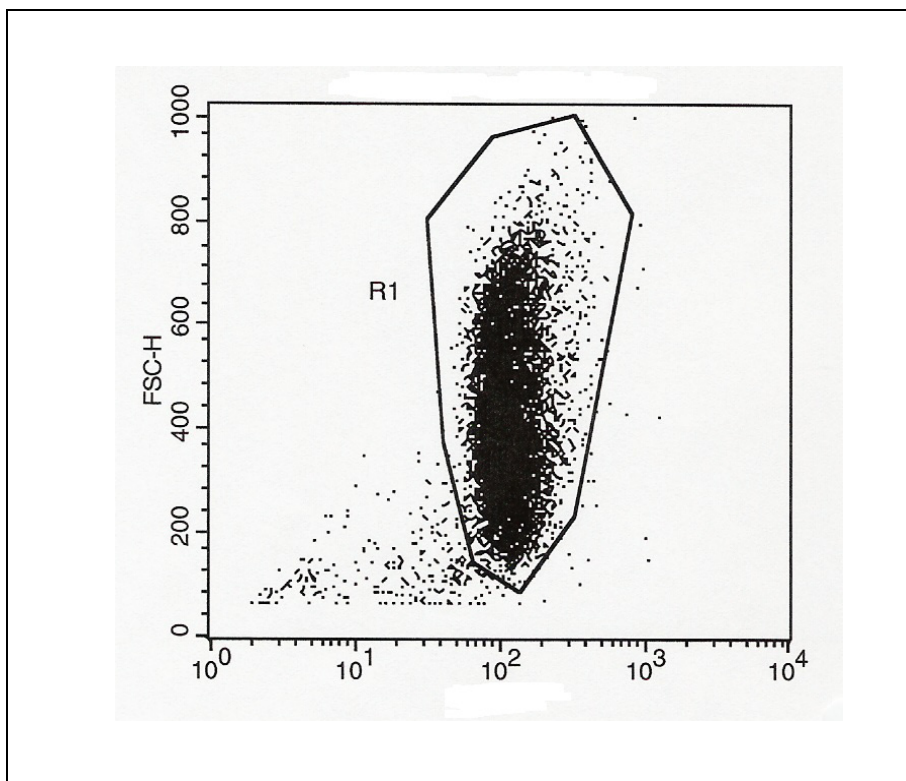


Abb.11: HT-29 Zellen mittels FACSort, FSC-Height / SSC-Height

## E-Cadherin Expression auf HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden mit einem unmarkierten anti-E-Cadherin-Antikörper und anschließend mit einem PE-markierten anti-E-Cadherin-Antikörper markiert und mittels FACSsort gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Expression von E-Cadherin un behandelter HT-29 Zellen (A) bzw. die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörper (B). Nach Bildung von Mittelwerten aus den jeweiligen Doppelansätzen wird der geo-mean der entsprechenden Isotypkontrolle vom geo-mean des spezifischen Antikörpers abgezogen.

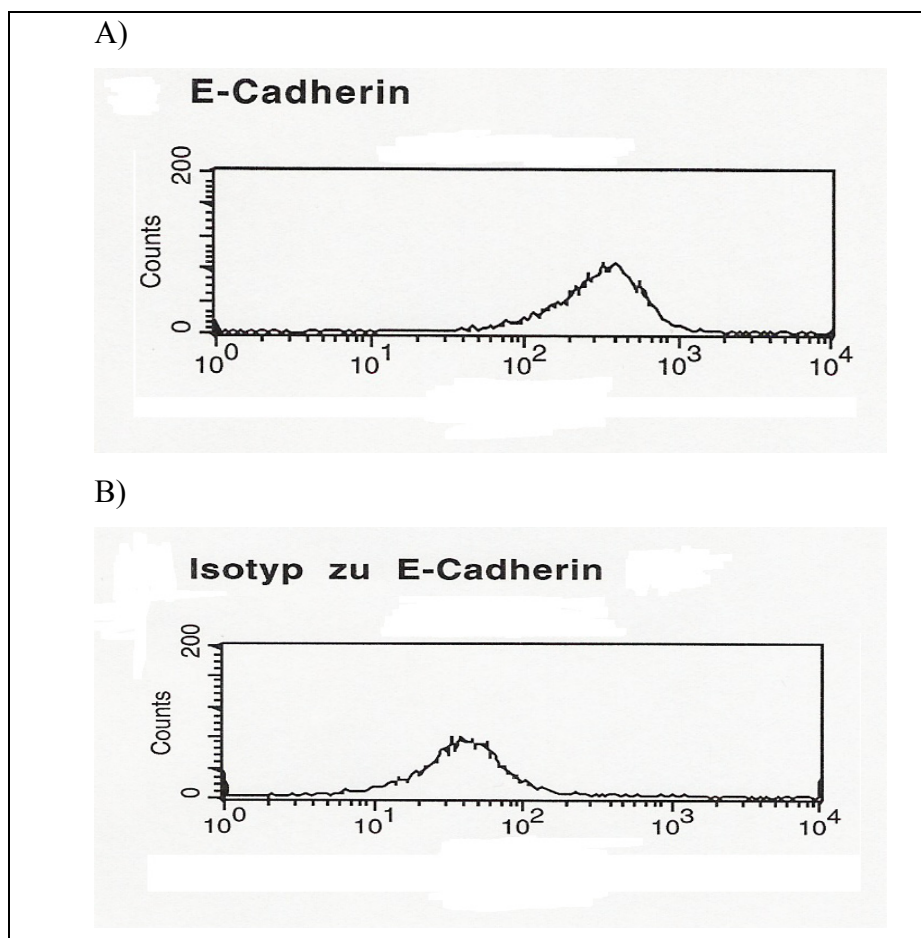


Abb.12: A) E-Cadherin Expression /  $\alpha$ -Maus IgG1 PE,

B) Isotyp zu E-Cadherin / IsoMaus IgG1,  $\alpha$ -Maus IgG1 PE

## CD44v6 Expression auf HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden mit einem FITC-markierten anti-CD44v6 Antikörper markiert und mittels FACSORT gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Expression von CD44v6 unbehandelter HT-29 Zellen (A) bzw. die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörper (B).

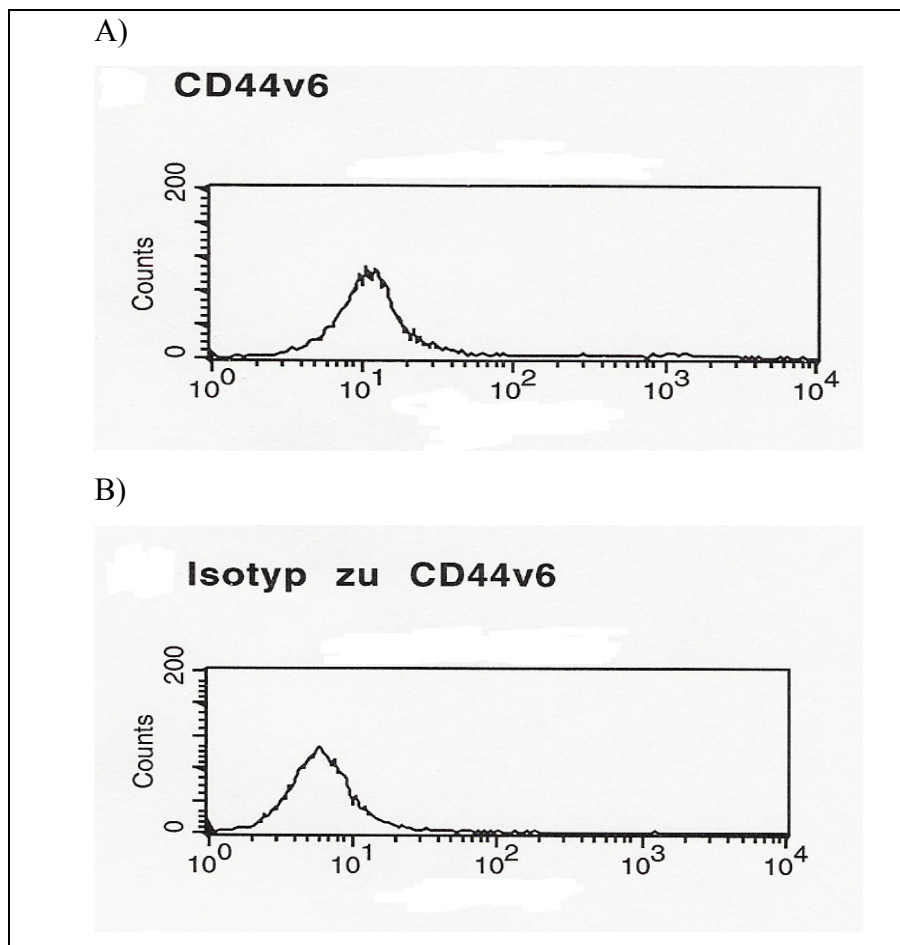


Abb.13: A) CD44v6 Expression / CD44v6 FITC,  
B) Isotyp zu CD44v6 / Maus IgG1 FITC

## CD54 (ICAM-1) Expression auf HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden mit einem PE-markierten anti-CD54 Antikörper markiert und mittels FACSsort gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Expression von CD54 un behandelter HT-29 Zellen (A) bzw. die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörper (B).

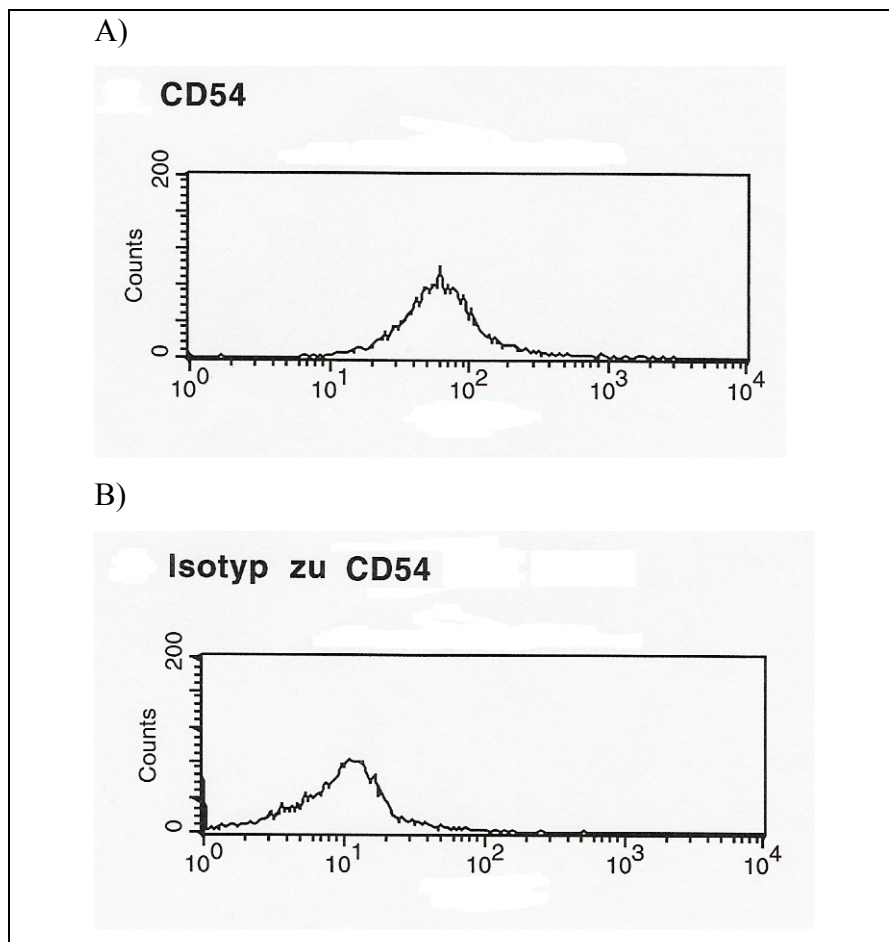


Abb.14: A) CD54 Expression / CD54 PE,

B) Isotyp zu CD54 / Maus IgG1 PE



## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) Expression auf HT-29 Zellen

HT-29 Zellen wurden mit einem PE-markierten anti-CD29 Antikörper markiert und mittels FACSsort gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Expression von CD29 un behandelter HT-29 Zellen (A) bzw. die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörper (B).

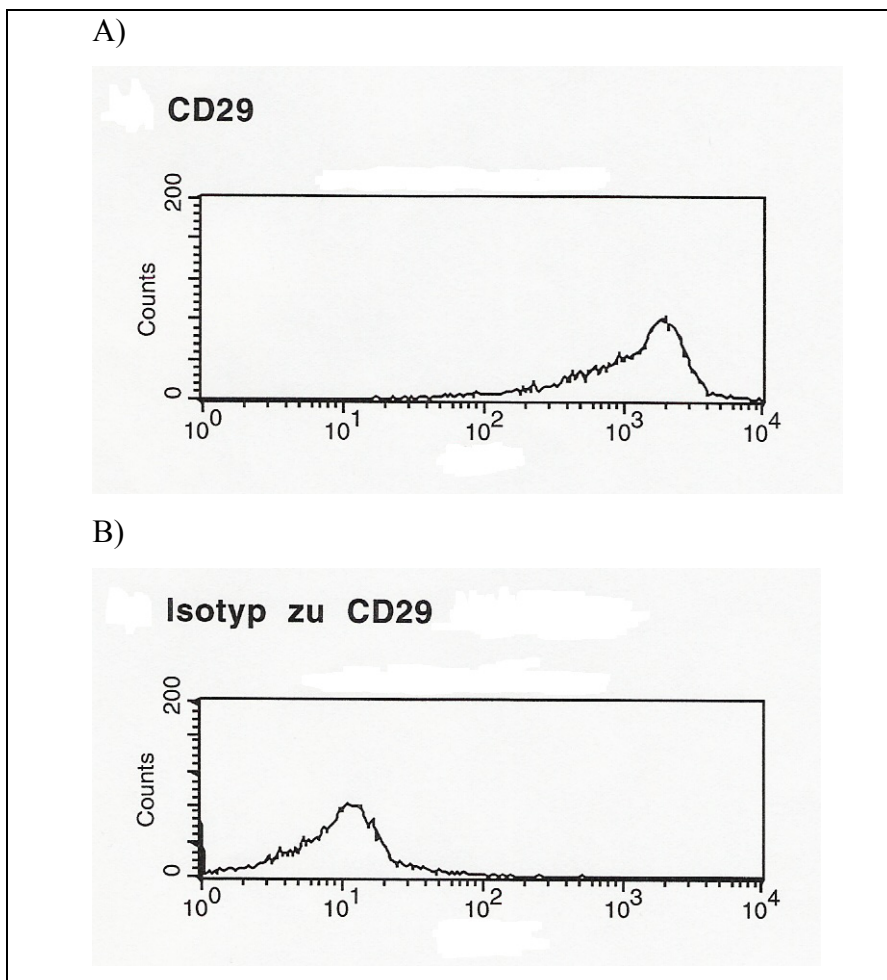


Abb.15: A) CD29 Expression / CD29 PE,

B) Isotyp zu CD29 / Maus IgG1 PE

#### 4.2.1 Adhäsionsmolekülexpression auf unbehandelte HT-29-Zellen

Die Basisexpression der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, CD44v6, CD54 (ICAM-1) und CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) auf unbehandelte HT-29 Kolonkarzinomzellen sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, CD44v6, ICAM-1 und  $\beta$ 1-Integrin werden auf HT-29 Karzinomzellen unterschiedlich stark expremiert und variieren stark von einander. Die geringste Expressionsstärke zeigt das Adhäsionsmolekül CD54, gefolgt von E-Cadherin, CD44v6 und schließlich CD29. Das  $\beta$ 1-Integrin (CD29) zeigt dabei die größte Streubreite. Das bedeutet, dass die Expressionsstärke besonders von CD29 der unbehandelten Zellen von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt stark unterschiedlich ist.

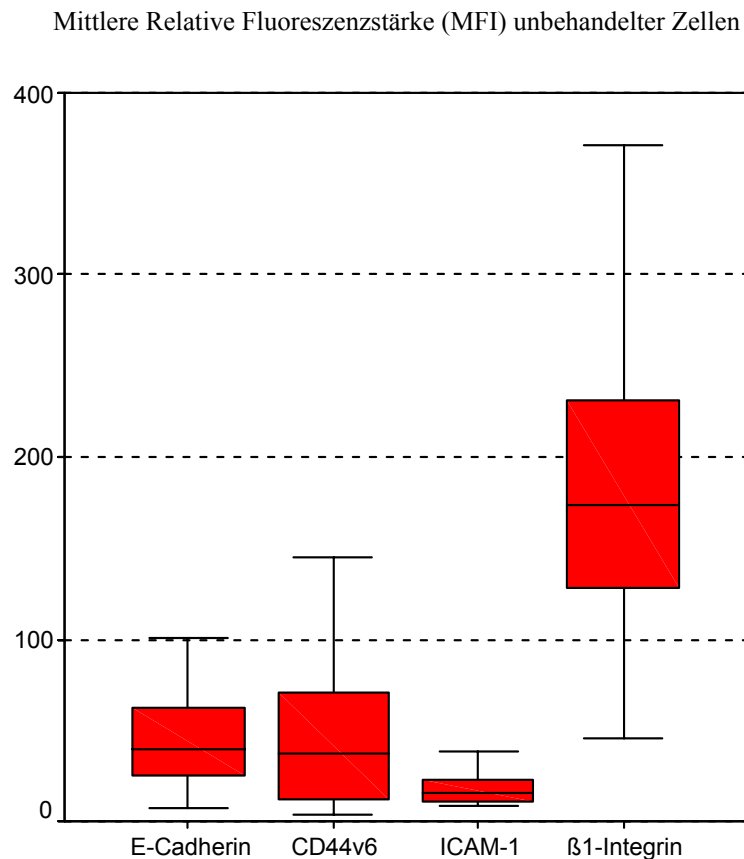


Abb. 16: Darstellung der Expression (Mittlere Relative Fluoreszenzstärke = MFI) der Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, CD44v6, CD54 (ICAM-1) und CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) auf unbehandelten HT-29 Zellen (Boxplot)

## 4.2.2 Einfluß von Gas, Druck und pH-Wert auf die E-Cadherin Expression

### E-Cadherin

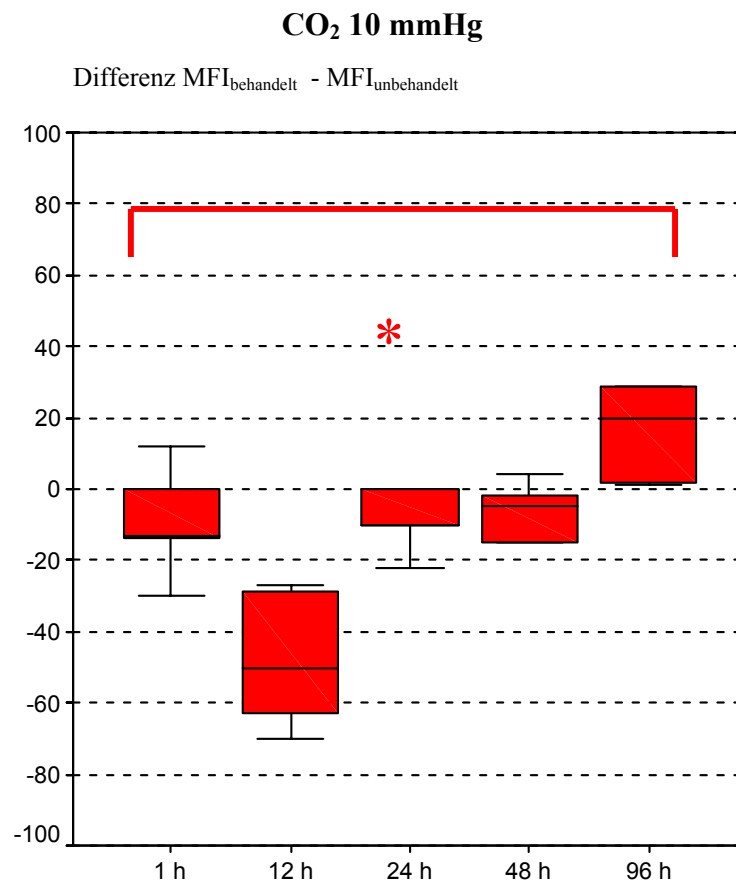


Abb.17: Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Begasung mit CO<sub>2</sub> bei 10 mmHg, Friedman-Test: p = 0,009

Unmittelbar nach Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid und einem Druck von 10 mmHg wird die Expression von E-Cadherin herunter reguliert. Dieser Abfall verstärkt sich bis 12 Stunden nach Inkubation. Anschließend normalisiert sich die Expression von E-Cadherin auf den Ausgangswert. 4 Tage nach Inkubation steigt die Expression von E-Cadherin erneut an. Der Expressionsverlauf von E-Cadherin nach Inkubation mit Kohlendioxid bei 10 mmHg ist signifikant unterschiedlich.

## E-Cadherin

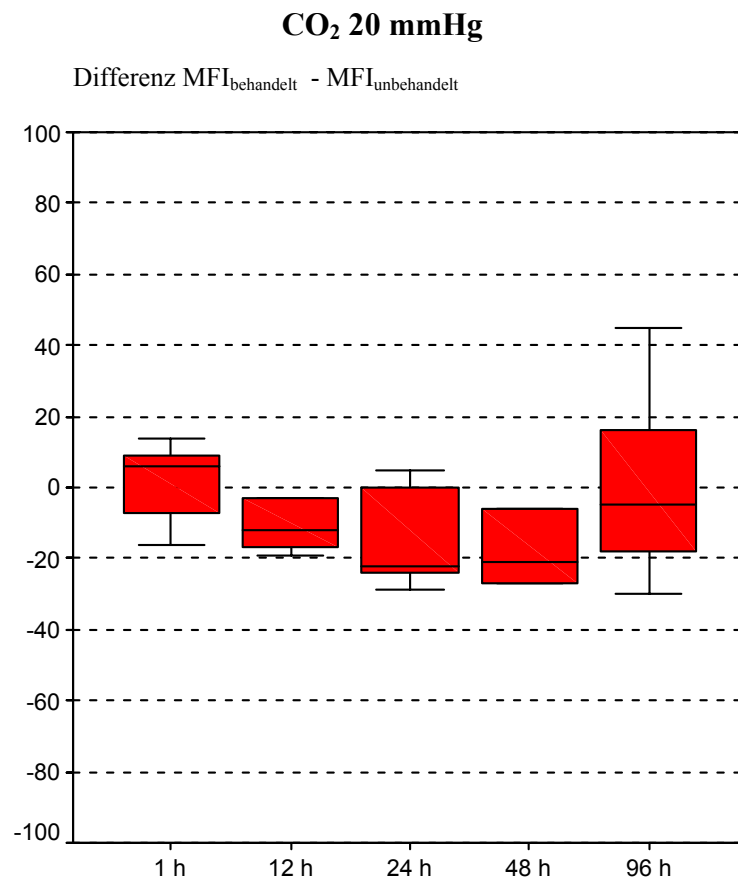


Abb.18: Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 20 mmHg, Friedman-Test:p = 0,36

Nach 30 minütiger Inkubation mit Kohlendioxid bei 20 mmHg wird die Expression von E-Cadherin auf HT-29 Karzinomzellen allenfalls geringgradig herunter reguliert. Ab dem 4. Tag nach Inkubation kommt es wieder zu einem diskreten Anstieg der Expression von E-Cadherin auf den HT-29 Zellen. Der gesamte Verlauf der Expression von E-Cadherin zeigt allerdings keine signifikanten Veränderungen.

## E-Cadherin

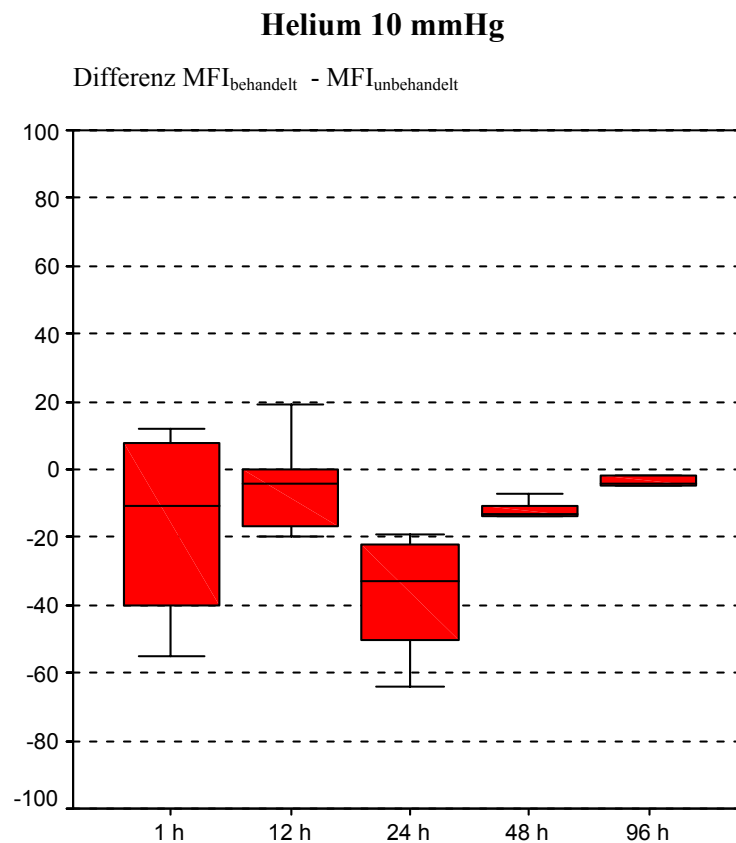


Abb.19: Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 10 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,07$

Nach 30 minütiger Inkubation der HT-29 Kolonkarzinomzellen mit Helium bei einem Druck von 10 mmHg scheint die Expression von E-Cadherin auf HT-29 Zellen ebenfalls abzufallen. Ab dem 2.Tag nach Inkubation steigt die Expressionstärke von E-Cadherin wieder leicht an. Eine signifikanter Unterschied kann im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden nicht nachgewiesen werden.

## E-Cadherin

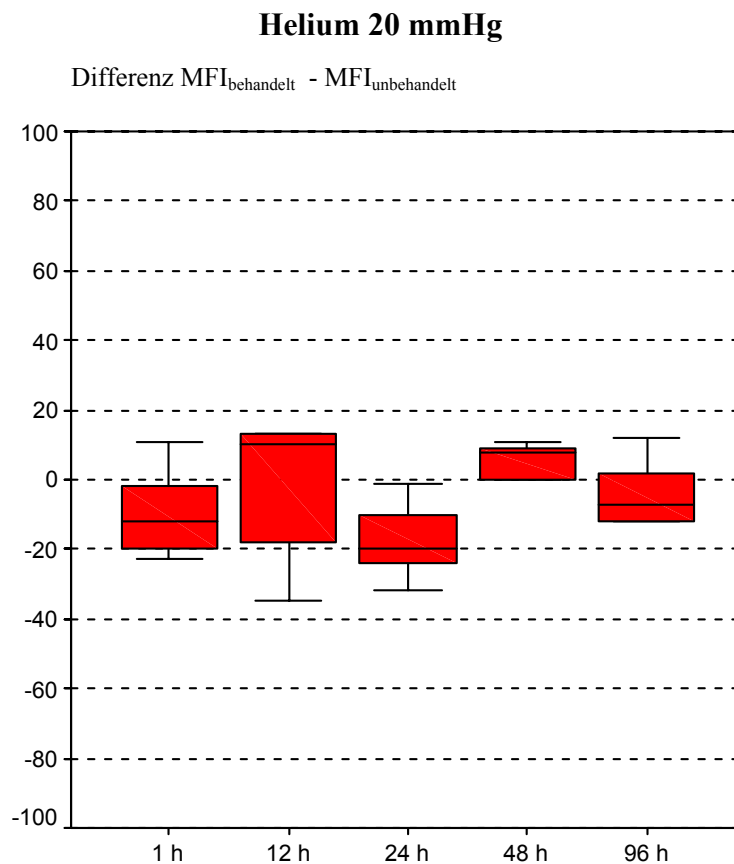


Abb.:20 Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 20 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,48$

Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen mit Helium bei einem Druck von 20 mmHg kommt es zu diskreten Schwankungen der Expressionsstärke von E-Cadherin auf HT-29 Zellen. Die Veränderungen der Expressionsstärke von E-Cadherin auf den Tumorzellen weisen allerdings keine einheitliche Richtung auf. Die Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden sind nicht signifikant unterschiedlich.

## E-Cadherin

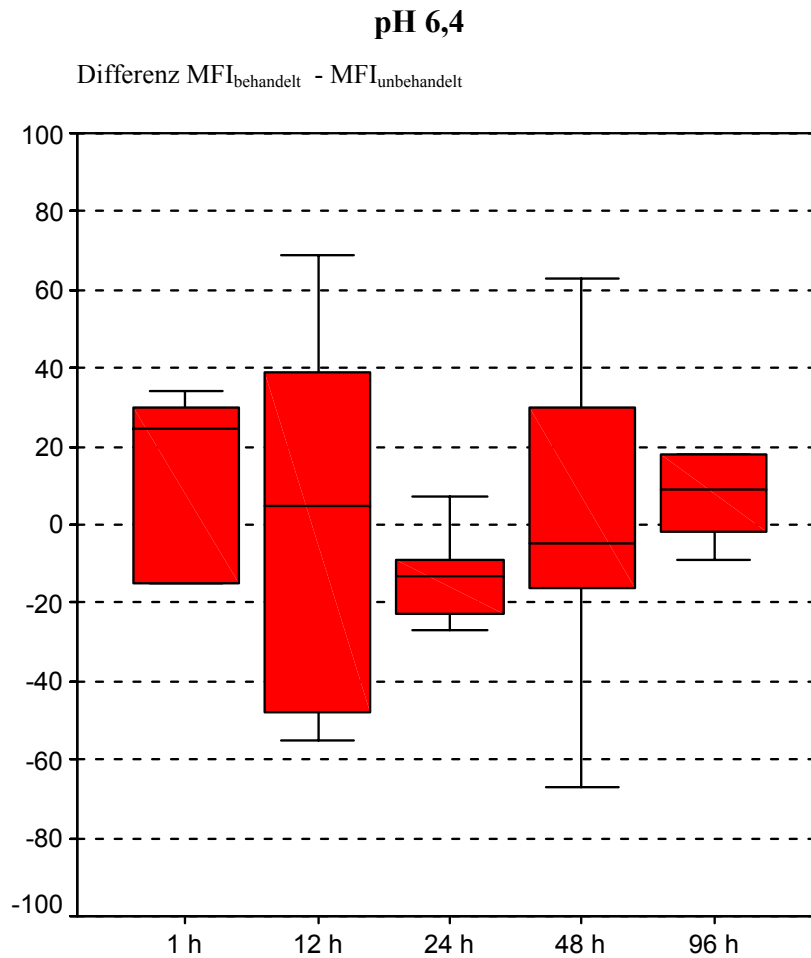


Abb.:21 Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 6,4 pH. Friedman-Test:  $p = 0,18$

Die Expression von E-Cadherin nach 30 minütiger Inkubation der HT-29 Tumorzellen im Medium mit einem pH von 6,4 führt zu einer relativ großen Schwankung innerhalb der verschiedenen Messzeitpunkte. Die Expression von E-Cadherin auf HT-29 Zellen zeigt während des zeitlichen Verlaufs jedoch keine einheitliche Richtung. Die Expression wird weder herauf noch herunter reguliert, ein signifikanter Unterschied kann nicht nachgewiesen werden.

## E-Cadherin

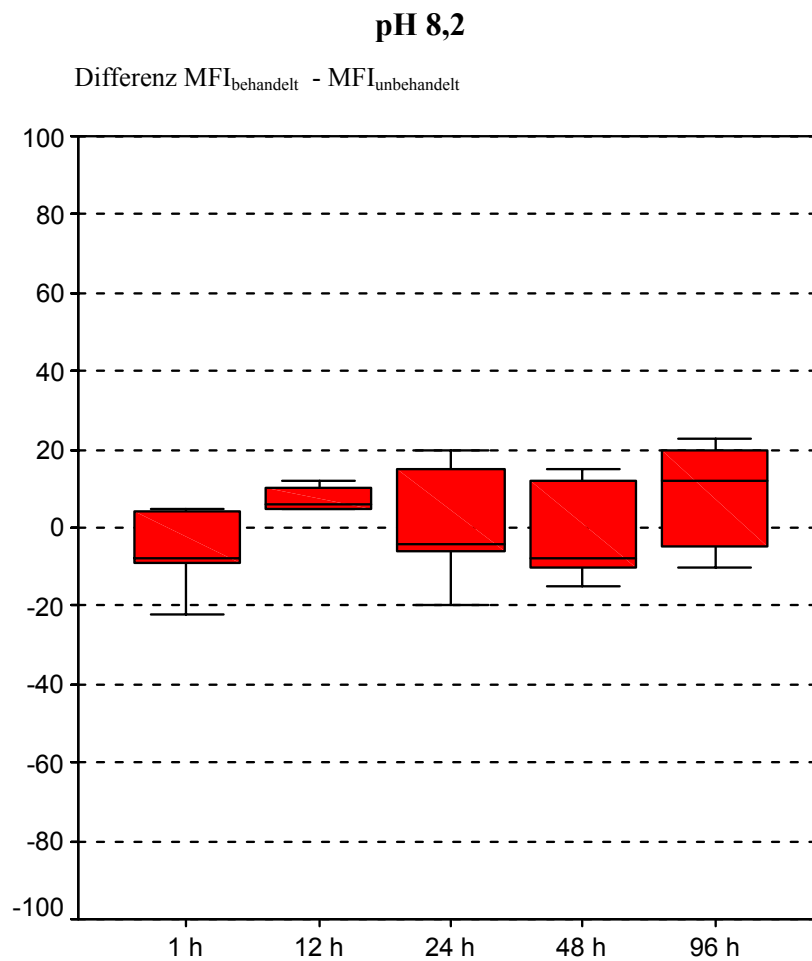


Abb.:22 Expression von E-Cadherin (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 8,2 pH. Friedman-Test:  $p = 0,1$

Die Expression von E-Cadherin auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im alkalischen Medium ( $pH=8,2$ ) zeigen deutlich geringere Schwankungen während der einzelnen Messzeitpunkte als im Vergleich zur Expression von E-Cadherin nach Inkubation in einem sauerem Medium. Eine signifikante Veränderungen der Expression im zeitlichen Verlauf ist weder im Sinne einer Stimulation bzw. Supprimierung zu erkennen.



### 4.2.3 Einfluß von Gas, Druck und pH-Wert auf die CD44v6 Expression

#### CD44v6

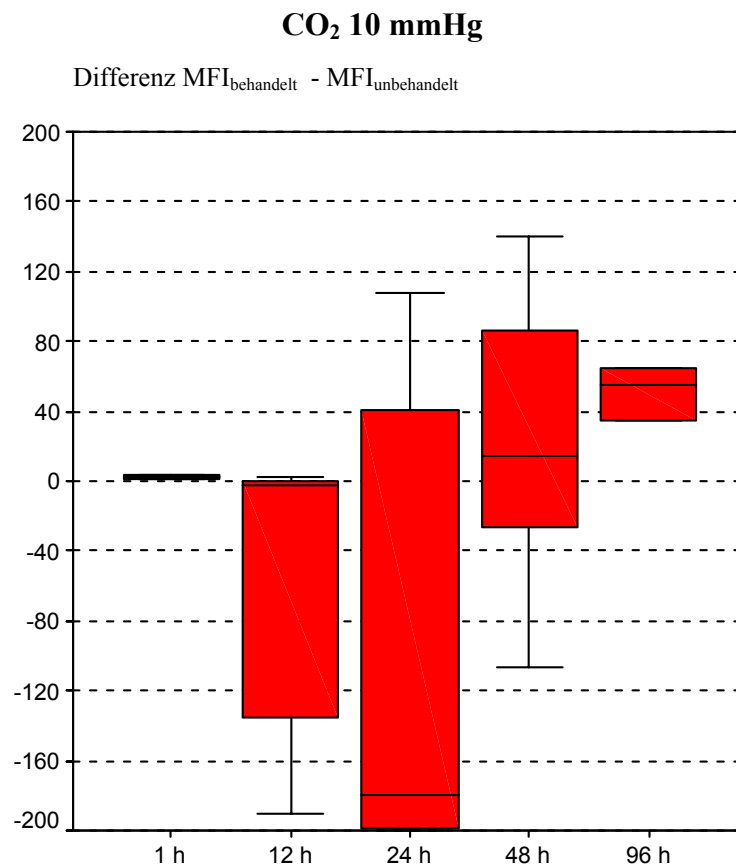


Abb.23: Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 10 mmHg, Friedman-Test: p = 0,26

Die 30 minütige Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid bei 10 mmHg scheint zunächst keinen Einfluß auf die Expression von CD44v6 zu haben. Im weiteren Verlauf fällt die Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen stark ab. Nach 48 Stunden wird die Expression erneut herauf reguliert. Aufgrund der großen Streubreite zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf der Expression von CD44v6.

## CD44v6

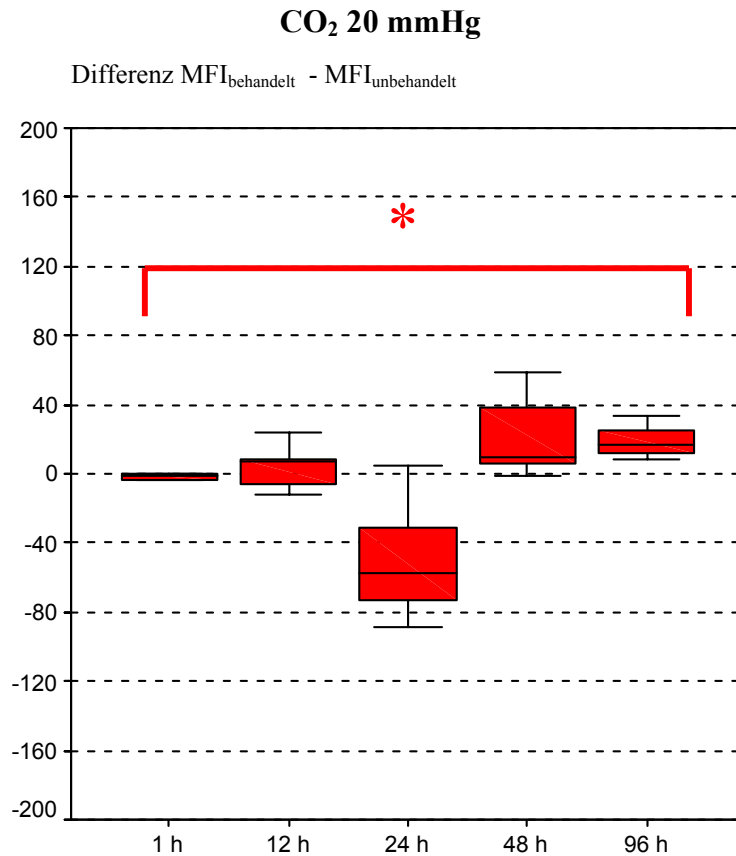


Abb.24: Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 20 mmHg, Friedman-Test:p = 0,001

Ähnlich wie bei 10 mmHg scheint die 30 minütiger Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid bei 20 mmHg zunächst keinen Einfluß auf die Expression von CD44v6 zu haben. Erst im weiteren Verlauf fällt die Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen ab. Nach 48 Stunden wird die Expression von CD44v6 wieder herauf reguliert. Im Gegensatz zu 10 mmHg ist die Streubreite der Messwerte bei 20 mmHg deutlich geringer. Die Expressionsveränderungen sind im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden signifikant unterschiedlich.

## CD44v6

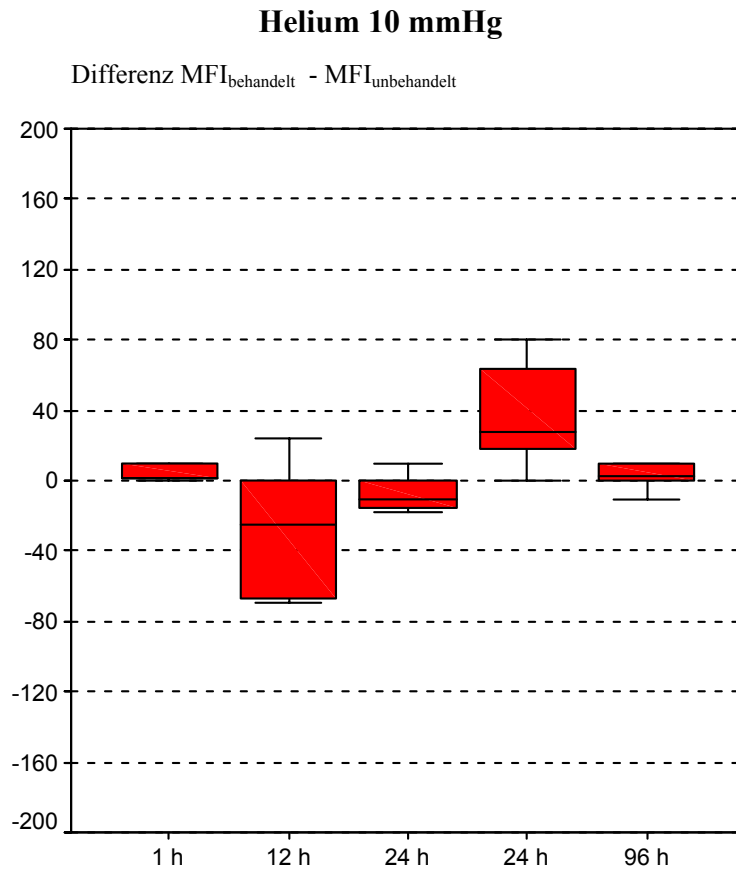


Abb.25: Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 10 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,11$

Die Expressionsstärke von CD44v6 auf HT-29 Zellen schwankt im gesamten zeitlichen Verlauf um den Ausgangswert. Die Inkubation der Tumorzellen mit Helium bei einem Druck von 10 mmHg führt zu keiner signifikanten Veränderung des Expressionsverhaltens von CD44v6.

## CD44v6

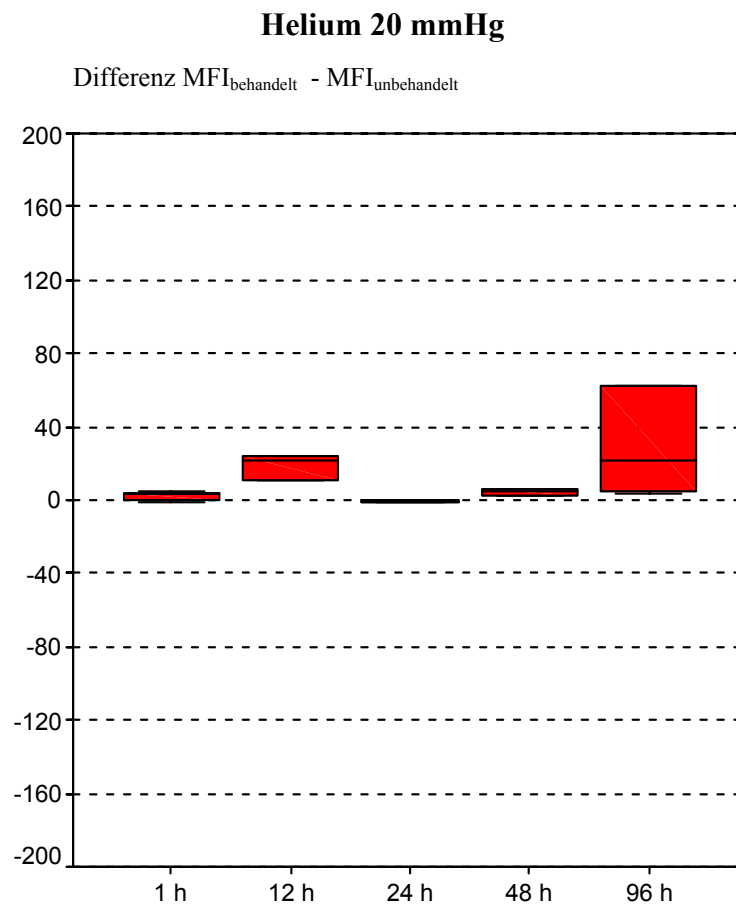


Abb.26: Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 20 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,3$

Die Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen bei der Inkubation mit Helium und 20 mmHg zeigt keine signifikanten Unterschiede. Die Expressionsergebnisse schwanken um den Ausgangswert.

## CD44v6

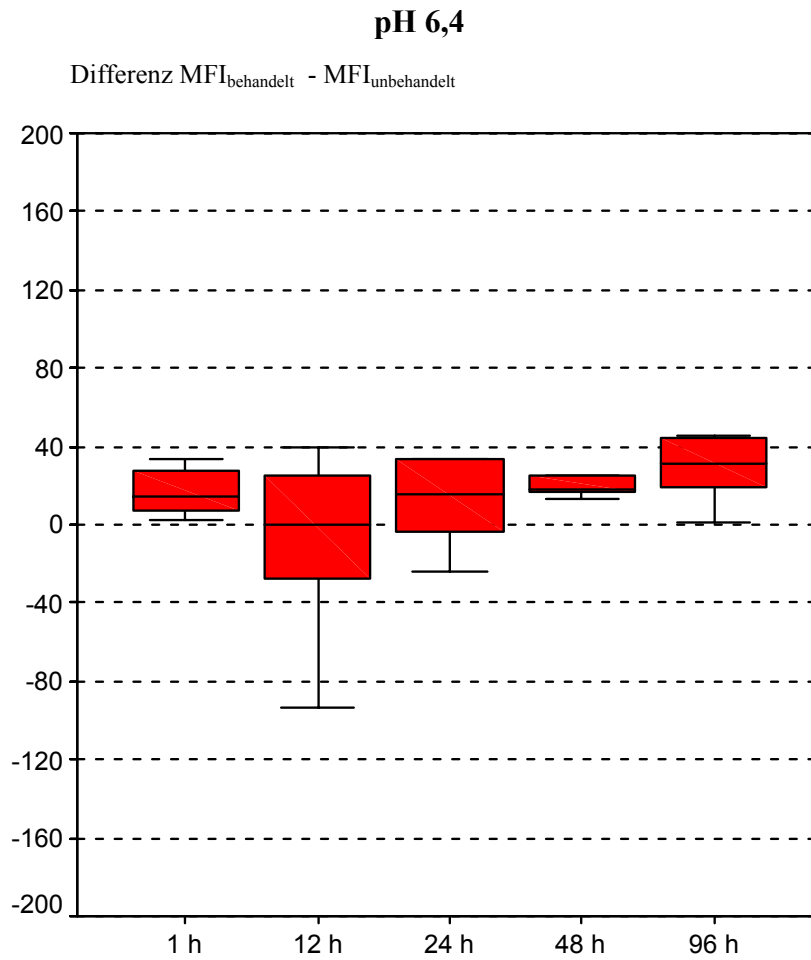


Abb.:27 Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 6,4 pH. Friedman-Test:  $p = 0,32$

Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im Medium mit einem pH von 6,4 kommt es zu geringen Schwankungen der Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen. Eine signifikante Veränderung liegt nicht vor.

## CD44v6

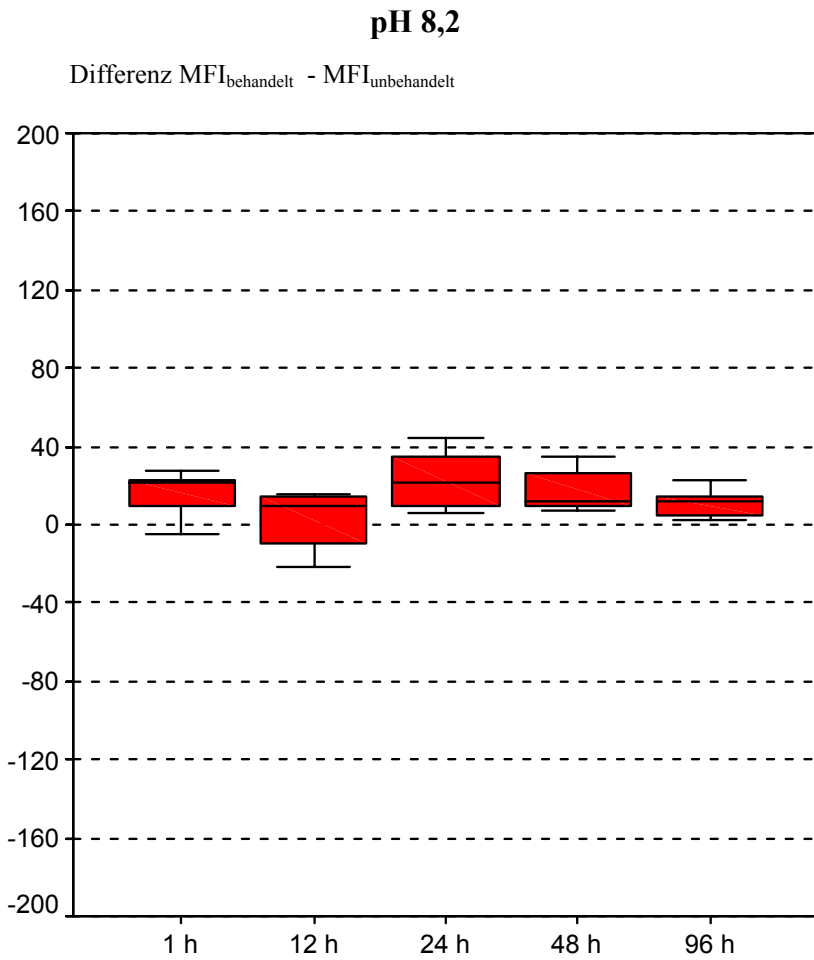


Abb.:28 Expression von CD44v6 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 8,2 pH. Friedman-Test:  $p = 0,12$

Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im Medium mit einem pH von 8,2 kommt es nur zu geringen Schwankungen der Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen. Signifikante Veränderungen liegen nicht vor.

#### 4.2.4 Einfluß von Gas, Druck und pH-Wert auf die ICAM-1 Expression

##### CD54 (ICAM-1)

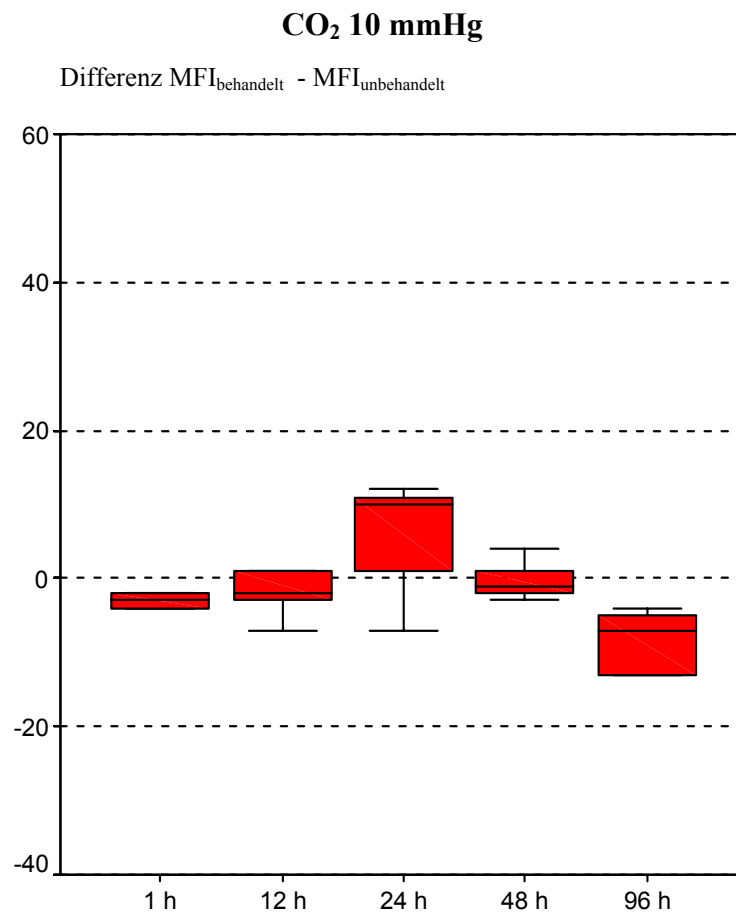


Abb.29: Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 10 mmHg, Friedman-Test: p = 0,08

Unmittelbar nach Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid und einem Druck von 10 mmHg wird die Expression von CD54 diskret herunter reguliert, steigt dann aber wieder leicht an, um im weiteren Verlauf wieder abzufallen. Der gesamte Expressionsverlauf von CD54 nach Inkubation mit Kohlendioxid zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Meßzeitpunkten.

## CD54 (ICAM-1)

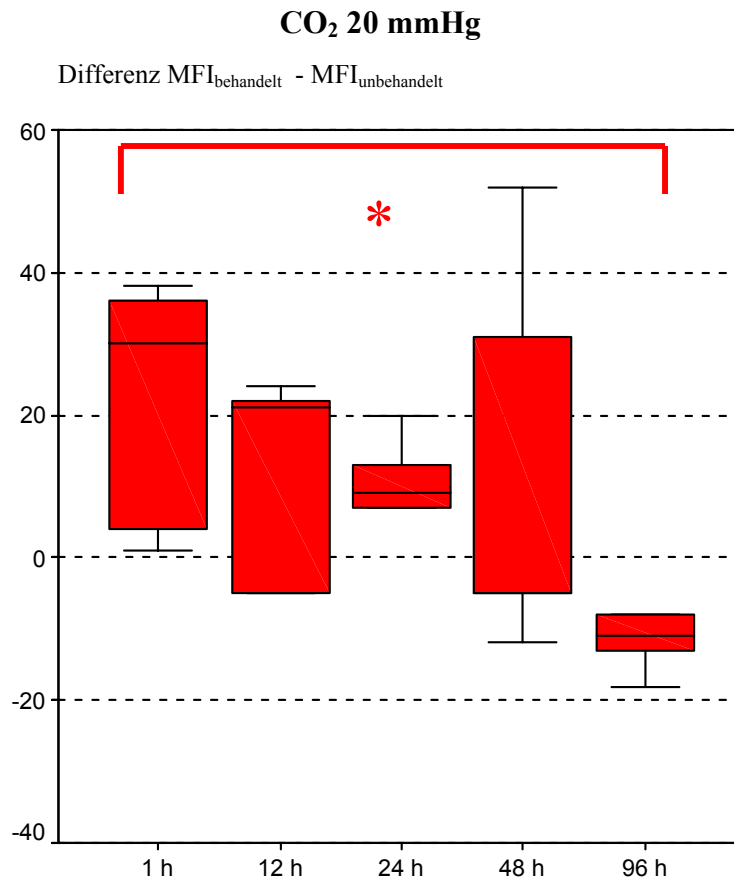


Abb.30: Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 20 mmHg, Friedman-Test:p = 0,04

Unmittelbar nach Inkubation der HT-29 Karzinomzellen mit Kohlendioxid und 20 mmHg kommt es zunächst zu einem deutlichen Anstieg der Expression des Adhäsionsmoleküls CD54. Im weiteren Verlauf fällt die Expression von CD54 kontinuierlich ab. Am 4. Tag nach Inkubation ist die Expression deutlich vermindert und geringer als der Ausgangswert. Die Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden sind signifikant unterschiedlich.



## CD54 (ICAM-1)

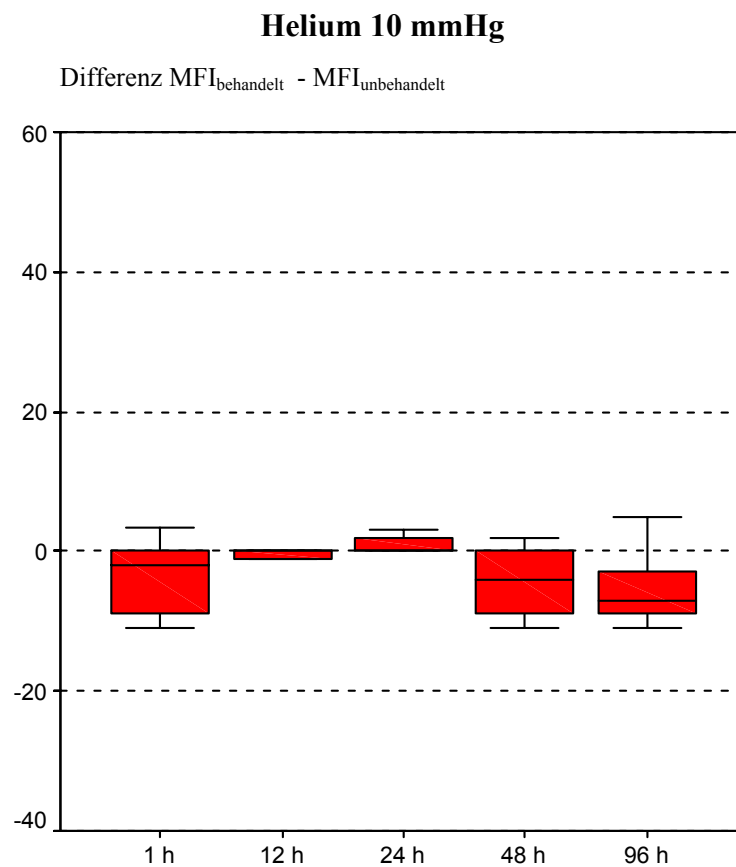


Abb.31: Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 10 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,1$

Nach 30 minütiger Inkubation von HT-29 mit Helium und einem Druck von 10 mmHg kommt es zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression von CD54. Zu allen Messzeitpunkten ändert sich die Expression nicht.

## CD54 (ICAM-1)

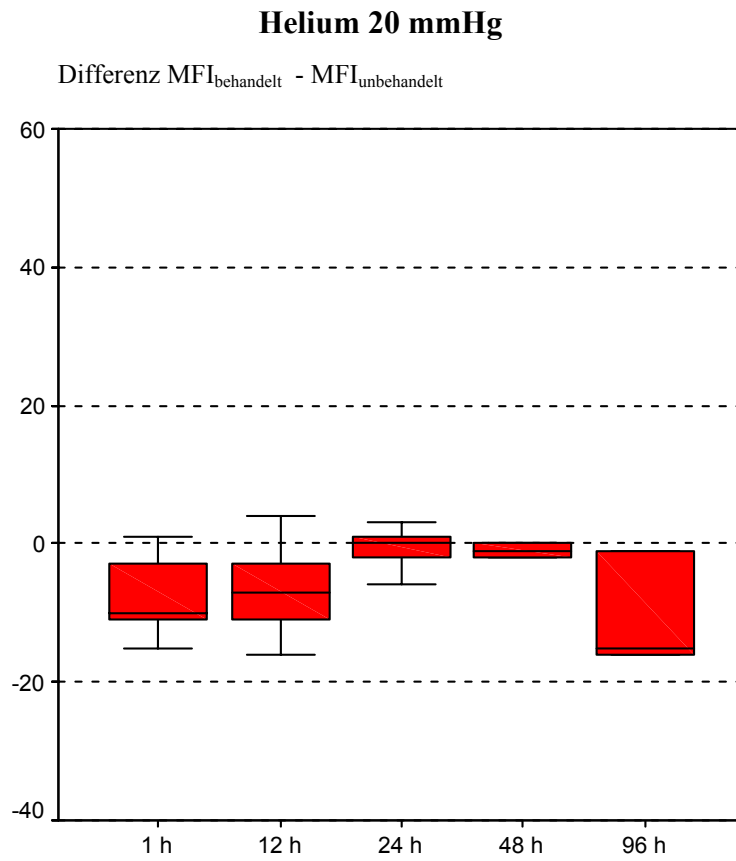


Abb.32: Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 20 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,6$

Ähnlich wie bei der Inkubation mit Helium bei 10 mmHg kommt es auch bei der Inkubation mit Helium und 20 mmHg zu keinen signifikanten Veränderungen der Expression von CD54 auf HT-29 Karzinomzellen. Die Expression von CD54 auf HT-29 Tumorzellen scheint zwar diskret herunter reguliert zu sein, die Ergebnisse sind jedoch innerhalb der Messzeitpunkte nicht signifikant unterschiedlich.

## CD54 (ICAM-1)

pH 6,4

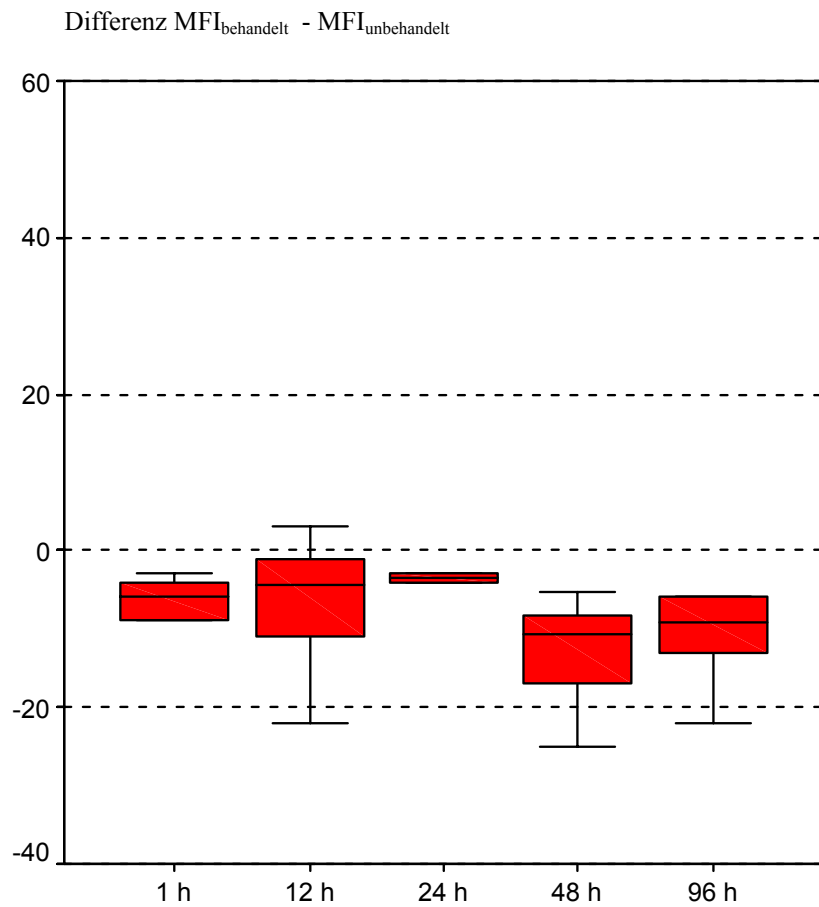


Abb.:33 Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 6,4 pH. Friedman-Test:  $p = 0,10$

Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im Medium mit einem pH von 6,4 kommt es zu leichten Abfall der Expression von CD54 auf HT-29 Zellen. Insgesamt jedoch zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

## CD54 (ICAM-1)

pH 8,2

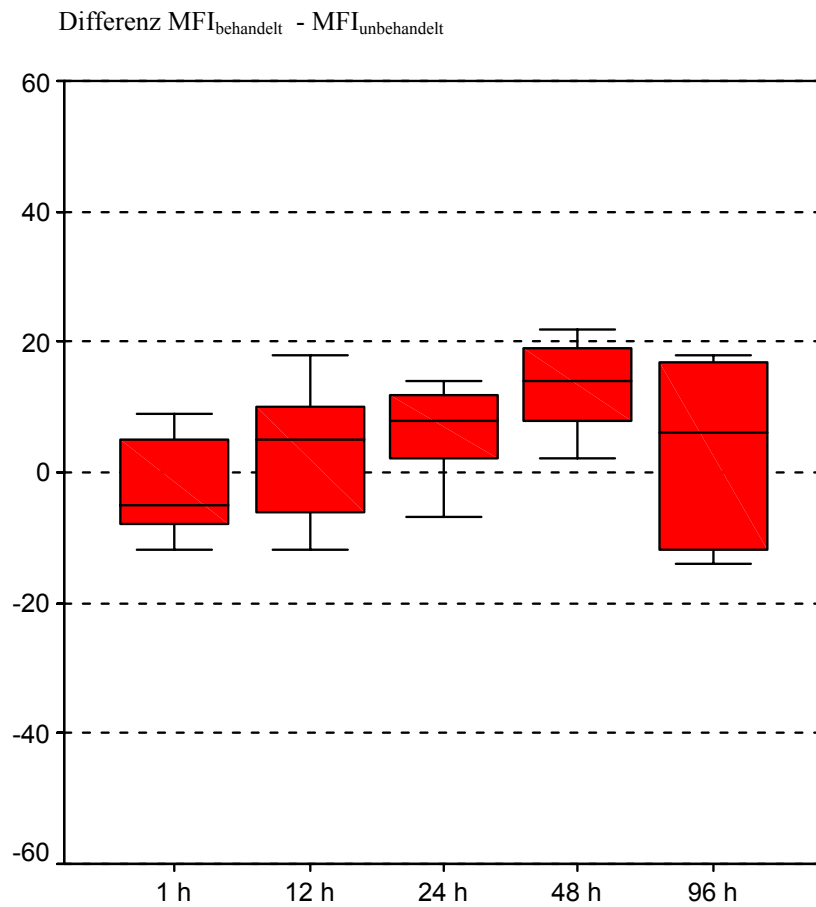


Abb.:34 Expression von CD54 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 8,2 pH. Friedman-Test:  $p = 0,09$

Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im Medium mit einem pH von 8,2 kommt es zu einem diskreten Anstieg der Expression von CD54 auf HT-29 Zellen. Insgesamt jedoch zeigen sich keine signifikanten Veränderungen.

#### 4.2.5 Einfluß von Gas, Druck und pH-Wert auf die $\beta$ 1-Integrin Expression

##### CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

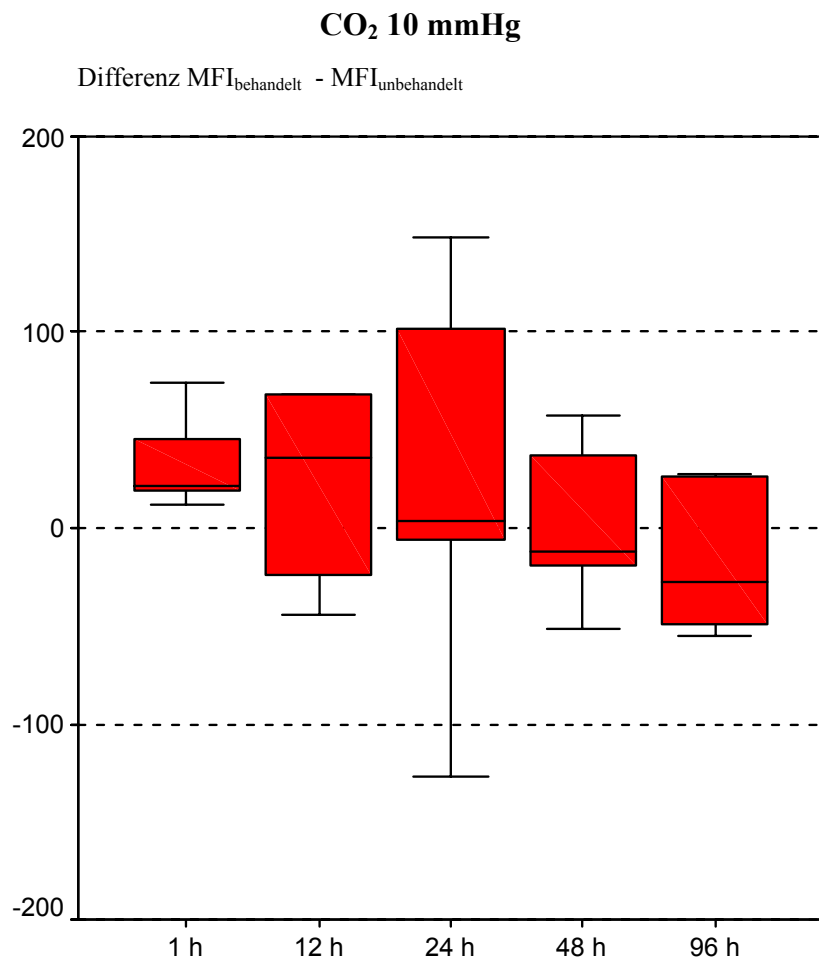


Abb.35: Expression von CD29 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 10 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,63$

Die Streubreite der Expression von CD29 ist im Vergleich zu den Adhäsionsmolekülen E-Cadherin, CD44v6 und CD54 über den gesamten Beobachtungsverlauf deutlich stärker. Die Expression von CD29 auf HT-29 Zellen scheint zunächst diskret zu steigen, fällt dann aber im zeitlichen Verlauf wieder ab. Signifikante Unterschiede lassen sich nicht nachweisen. Die Inkubation mit Kohlendioxid bei einem Druck von 10 mmHg scheint keinen Einfluß auf die Expression von CD29 zu haben.

## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

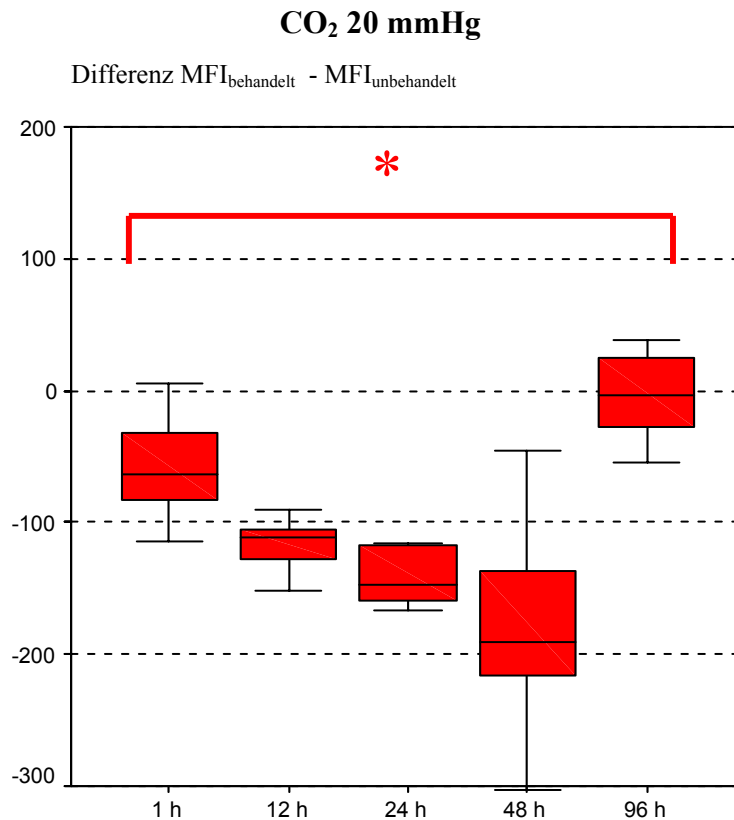


Abb.36: Expression von CD29 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit CO<sub>2</sub> bei 20 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,001$

Unmittelbar nach Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid bei einem Druck von 20 mmHg wird die Expression von CD29 auf HT-29 Zellen herunter reguliert. Die Reduktion der Expression verstärkt sich in den Folgestunden und hält bis zum 2. Tag nach der Inkubation an. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Wiederanstieg der Expression von CD29 auf HT-29 Zellen. Der Verlauf der unterschiedlichen Expression ist signifikant unterschiedlich.

## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

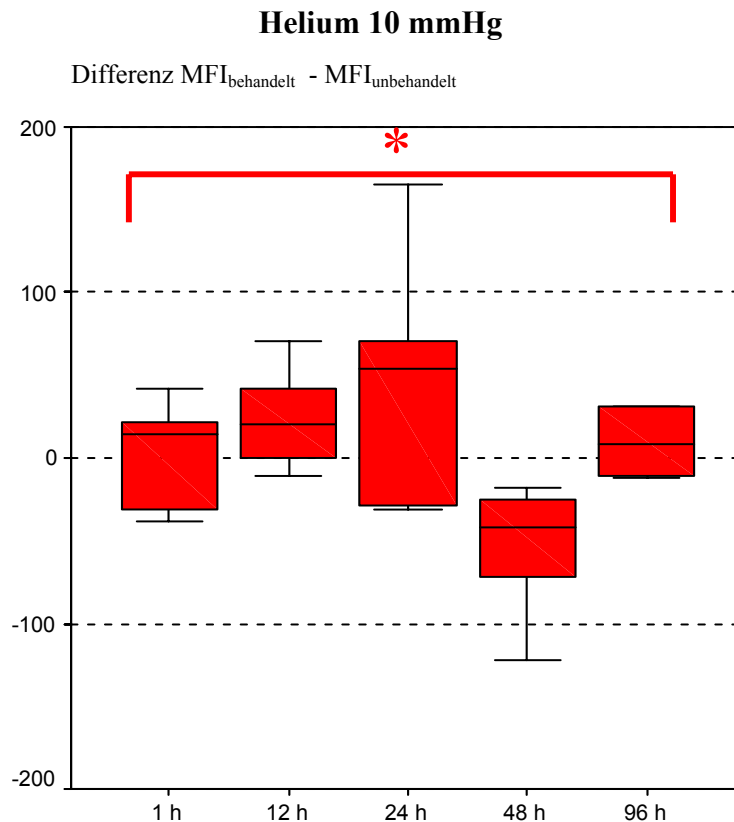


Abb.37: Expression von CD29 (MFI unbehandelt minus MFI behandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 10 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,009$

Im Verlauf der Expression des Adhäsionsmoleküls CD29 nach Inkubation mit Helium bei einem Inkubationsdruck von 10 mmHg deutet sich zunächst eine geringe Verstärkung der Expression auf HT-29 Zellen an. Im weiteren Verlauf kommt es dann aber wieder zu einem Abfall der Expression von CD29 auf HT-29 Zellen. Diese Herunterregulierung der Expression ist allerdings nur von kurzer Dauer, nach 96 Stunden steigt die Expression erneut an. Insgesamt ist die Expression von CD29 auf den Tumorzellen im zeitlichen Verlauf signifikant unterschiedlich.

## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

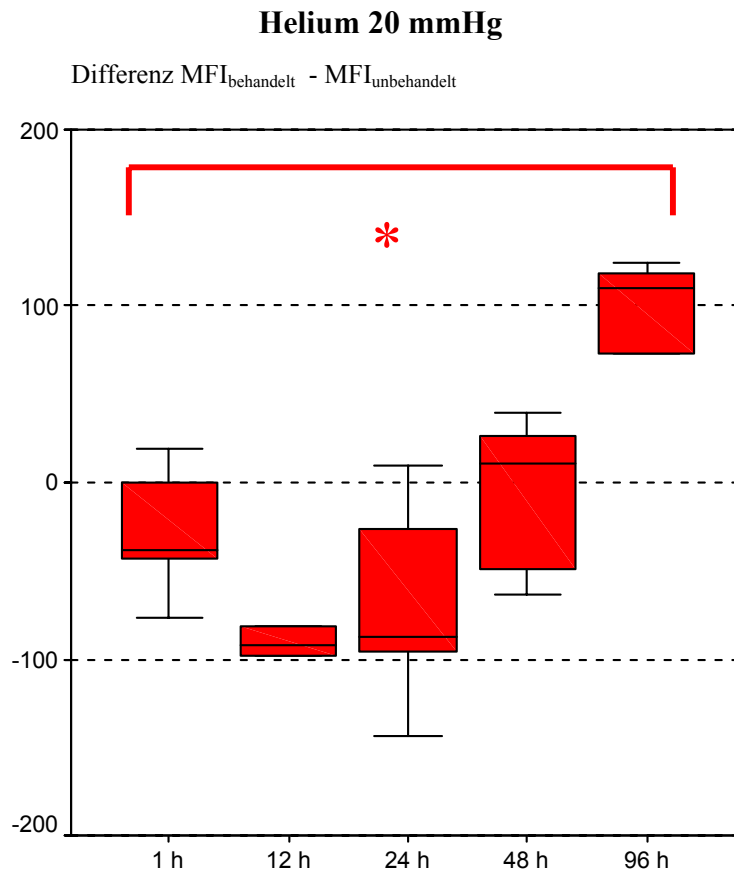


Abb.38: Expression von CD29 (MFI unbehandelt minus MFI behandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Helium bei 20 mmHg, Friedman-Test:  $p = 0,01$

Nach Inkubation der HT-29 Zellen mit Helium und einem Druck von 20 mmHg kommt es zunächst zu einem deutlichen Abfall der Expression von CD29 auf den HT-29 Karzinomzellen. Die verminderte Expression hält bis zum 2. Tag nach Inkubation an, um dann erneut anzusteigen. Nach 4 Tagen ist die Expression von CD29 auf den Tumorzellen deutlich hoch reguliert. Die Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden sind signifikant unterschiedlich.



## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

pH 6,4

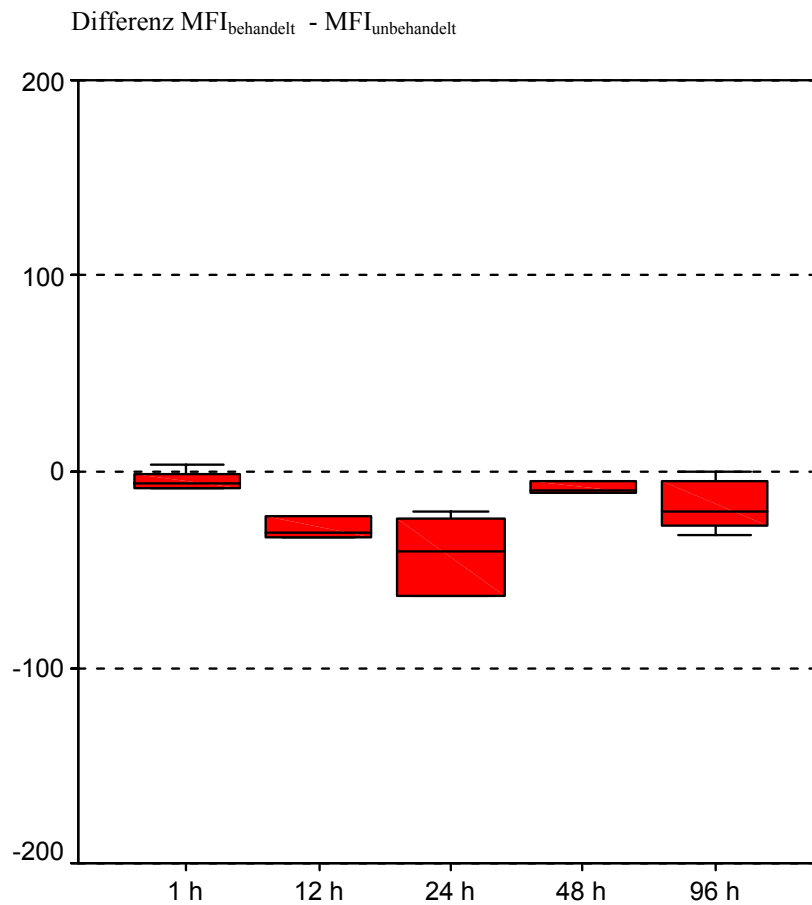


Abb.:39 Expression von CD29 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 6,4 pH. Friedman-Test:  $p = 0,1$

Einen Einfluß eines saueren Mediums auf die Expression von CD29 auf HT-29 Zellen kann nicht nachgewiesen werden. Nach 30 minütiger Inkubation der Tumorzellen im Medium mit einem pH von 6,4 kommt es zwar zu einem diskreten Abfall der Expression von CD29 auf HT-29 Zellen, insgesamt jedoch zeigen sich keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf.

## CD29 ( $\beta$ 1-Integrin)

pH 8,4

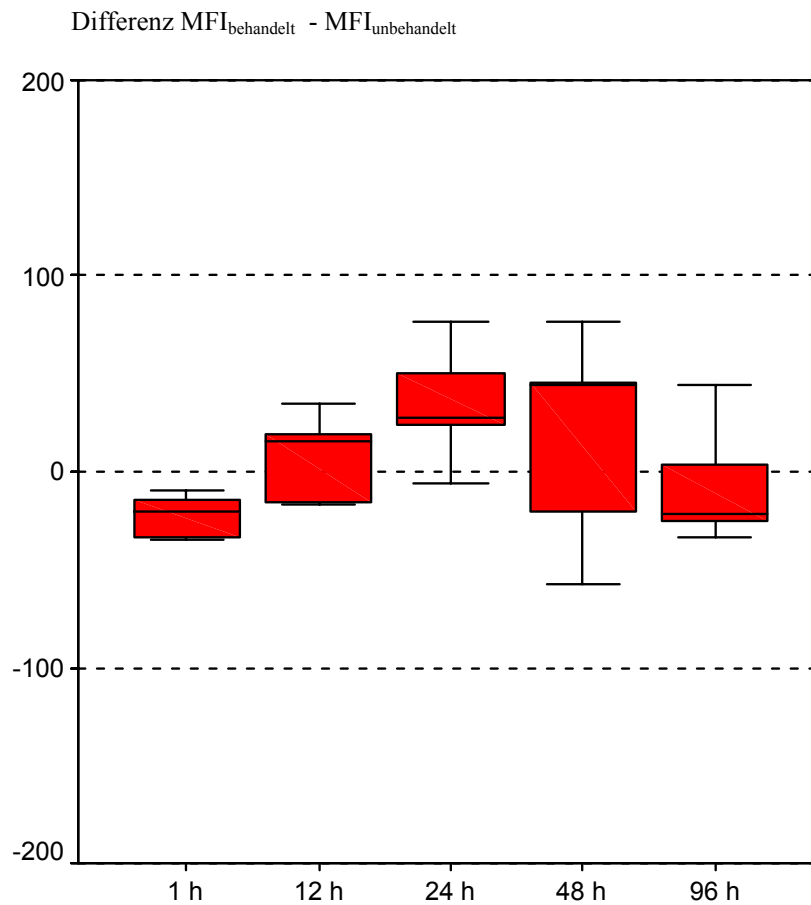


Abb.:40 Expression von CD29 (MFI behandelt minus MFI unbehandelt) im zeitlichen Verlauf auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation im Medium mit 6,4 pH. Friedman-Test:  $p = 0,11$

Nach 30 minütiger Inkubation der HT-29 Tumorzellen im Medium mit einem pH-Wert von 8,2 kommt es zunächst zu einem diskreten Anstieg der Expression von CD29. Anschließend wird die Expressionsstärke von CD29 auf HT-29 Zellen erneut herunter reguliert. Die Expressionsveränderungen im zeitlichen Verlauf von 96 Stunden sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

### 4.3 Intrazelluläres Kalzium von HT-29-Zellen

#### 4.3.1 Aufnahme von FURA2-AM durch HT-29-Zellen

Für die Kalziumbestimmungen wurden HT-29-Zellen mit FURA2-AM (1  $\mu\text{mol/L}$ ) für 30 Minuten bei Raumtemperatur beladen. Durch diese Bedingungen stellen sich die HT-29 Zellen homogen im Fluoreszenzlicht dar.

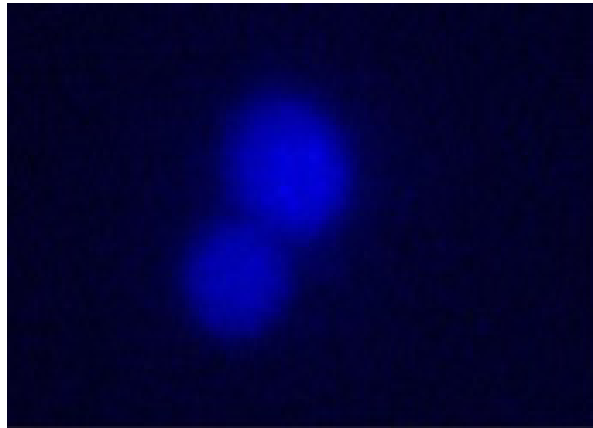


Abb.41: HT-29-Zellen nach Beladung mit FURA2-AM. Die Anregung erfolgt mit Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 380 nm und anschließender digitaler Bearbeitung.

Unter Ruhebedingungen zeigen die HT-29 Zellen einen bestimmten Fluoreszenzratiowert. Alle folgenden Angaben zur Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beziehen sich auf die Änderung dieses Wertes und sind mit Hilfe des Ionoquant-Meßsystems ermittelt. Nach Inkubation (30 min) im verdunkelten Mini-Inkubator mit Kohlendioxid bei einem Druck von 10 mmHg zeigen die Tumorzellen eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration.

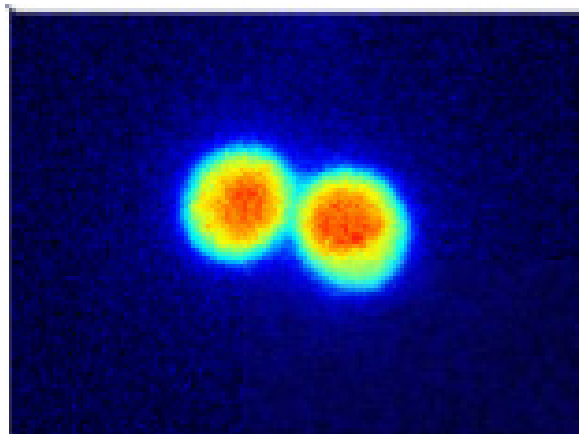


Abb.42: Fluoreszenzimaging von HT-29-Zellen nach 30 min Inkubation mit  $\text{CO}_2$  bei einem Druck von 10 mmHg. Blaue Regionen kennzeichnen einen geringen Kalziumgehalt, rote einen hohen.

### 4.3.2 $[Ca^{2+}]_i$ nach Kohlendioxidinkubation bei 10 und 20 mmHg

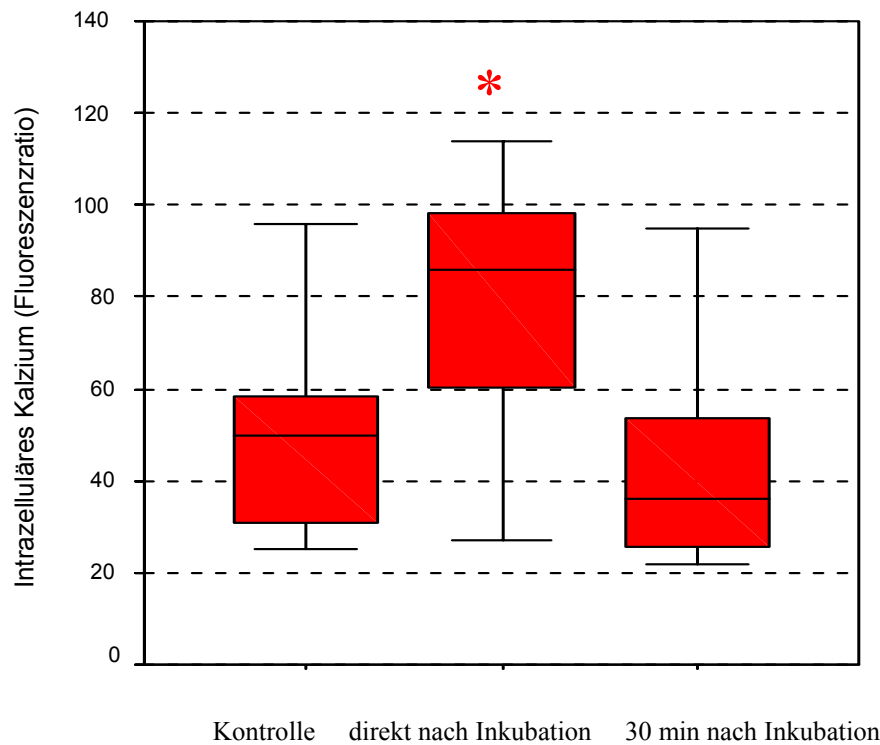


Abb.43: Intrazelluläre Kalziumkonzentration nach 30 minütiger  $CO_2$  Inkubation bei 10 mmHg, n = 100 HT-29 Zellen, t-Test:  $p=0,001$

Unmittelbar nach Inkubation der Tumorzellen mit Kohlendioxid und einem Druck von 10 mmHg steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Zellen signifikant an ( $p<0,001$ ). 30 Minuten nach Inkubation liegt die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder im Ausgangsbereich.

Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unmittelbar nach 30minütiger CO<sub>2</sub> Inkubation und 30 Minuten später bei 20 mmHg im Vergleich zum Ausgangswert

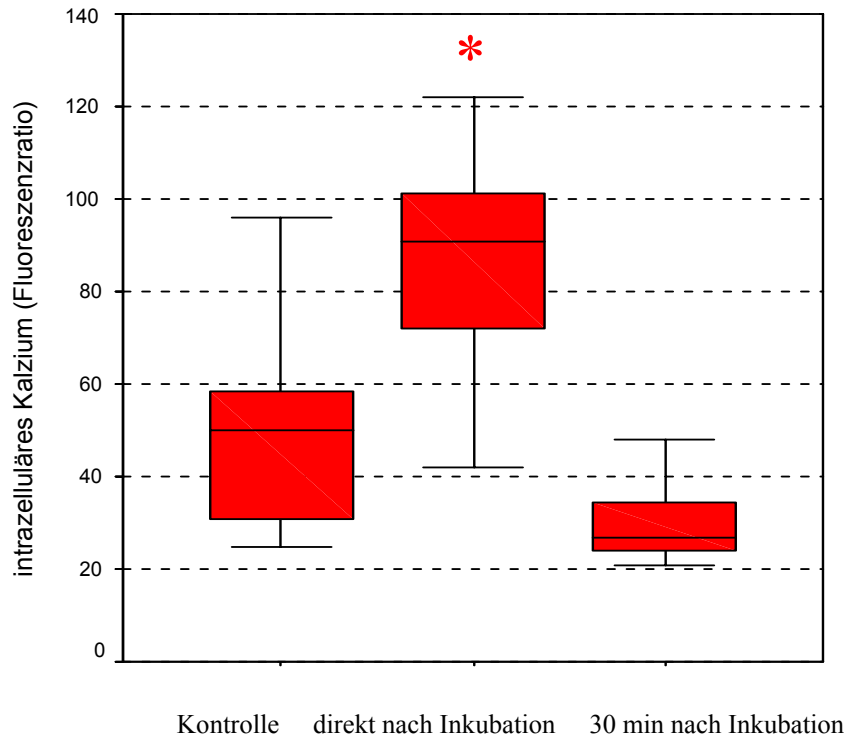


Abb.44: Intrazelluläre Kalziumkonzentration nach 30 minütiger CO<sub>2</sub> Inkubation bei 20 mmHg, n = 100 HT-29 Zellen, t-Test: p<0,001

Einen ähnliche Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Tumorzellen findet sich nach Inkubation in Kohlendioxid mit einem Druck von 20 mmHg. Die Inkubation führt zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den Tumorzellen p<0,001. 30 Minuten später fällt die intrazelluläre Kalziumkonzentration unterhalb des Ausgangswertes, ein signifikanter Unterschied zum Kontrollwert besteht nicht. Ein Unterschied zwischen 10 mmHg und 20 mmHg besteht nicht.

### 4.3.3 $[Ca^{2+}]_i$ nach Heliuminkubation bei 10 und 20 mmHg

Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unmittelbar nach 30minütiger Helium Inkubation und 30 Minuten später bei 10 mmHg im Vergleich zum Ausgangswert

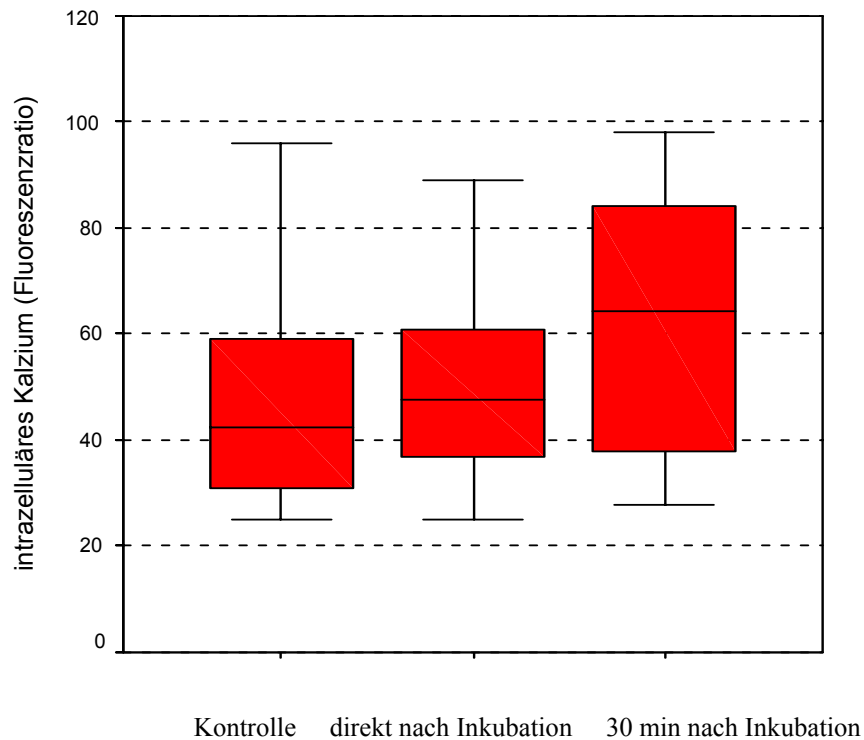


Abb.45: Intrazelluläre Kalziumkonzentration nach 30 minütiger Heliuminkubation bei 10 mmHg, n = 100 HT-29 Zellen, t-Test: p=0,56

Nach Inkubation der Tumorzellen in Helium bei einem Druck von 10 mmHg kommt es zu keinen Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen. 30 Minuten später zeigt sich eine diskrete Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, der Unterschied ist allerdings zum Kontrollwert nicht signifikant.

Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration unmittelbar nach 30 minütiger Helium Inkubation und 30 Minuten später bei 20 mmHg im Vergleich zum Ausgangswert

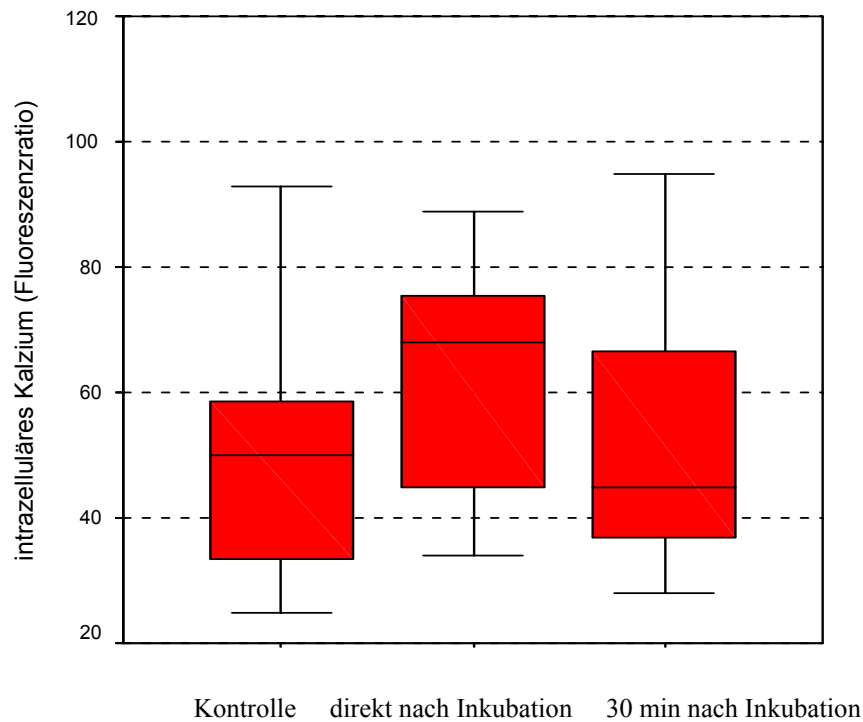


Abb.46: Intrazelluläre Kalziumkonzentration nach 30 minütiger Heliuminkubation bei 20 mmHg, n = 100 HT-29 Zellen, t-Test: p=0,45

Wie bei einem Druck von 10 mmHg führt auch die Inkubation der Tumorzellen in Helium bei einem Druck von 20 mmHg zu keinen signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Kalziumkonzentration. Unmittelbar nach Inkubation kommt es zwar zu einer diskreteten Erhöhung der Werte, der Unterschied ist aber nicht signifikant. 30 Minuten später sinkt die intrazelluläre Kalziumkonzentration wieder leicht ab, auch dieser Abfall ist nicht signifikant zum Ausgangswert. Ein Unterschied zwischen den beiden Drücken (10 mmHg/ 20 mmHg) kann nicht nachgewiesen werden.