

## 5. Diskussion

Seit Einführung der laparoskopischen onkologischen Chirurgie wird das Thema Tumorwachstum und Trokarmetastasen heftig diskutiert, obwohl inzwischen immer deutlicher wird, dass die Inzidenz an Trokarmetastasen eher gering ist.

Trotzdem ist eine Trokarmetastase eine dramatische und folgenreiche Komplikation nach laparoskopischer Entfernung eines malignen Tumors. Bis heute wurden weit über 100 Fälle von Inzisionsmetastasen publiziert (100). Inzisionsmetastasen treten jedoch klinisch nicht nur nach laparoskopischen Eingriffen auf, auch in der offenen konventionellen Chirurgie ist diese Form der Metastasenbildung bekannt. Die Inzidenz beträgt in einigen Studien ca. 0,6-1,6% (101,102).

Umfangreiche Berichte von größeren klinischen Serien weisen jedoch darauf hin, dass die Inzidenz an Trokarmetastasen in der laparoskopischen Chirurgie sehr wahrscheinlich weniger als 2% beträgt (103). Diese Beobachtungen decken sich mit einer erst kürzlich veröffentlichten prospektiv, randomisierten Studie, die zeigen konnte, dass im Vergleich zur konventionellen Kolonchirurgie die laparoskopische Chirurgie zu keinem verstärktem Tumorwachstum führt (32). Ergebnisse weiterer prospektiv randomisierter Studien werden in den nächsten Jahren erwartet.

Trotz dieser ermutigenden Daten gibt es jedoch Hinweise, dass das für die Laparoskopie benötigte Pneumoperitoneum möglicherweise Konditionen schaffen könnte, die für das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung vorteilhaft erscheinen. In den letzten Jahren haben eine Reihe von Untersuchungen die Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen untersucht (33,40,41,42,44).

Jacobi und Mitarbeiter untersuchten z.B. in einem Tumormodell der Ratte den Einfluß der Laparotomie und der Laparoskopie mit unterschiedlichen Gasen (Luft, Kohlendioxid und Helium) auf das intraperitoneale und subkutane Tumorwachstum (40). In-vivo zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Stimulation des Tumorzellwachstums nach Inkubation mit Kohlendioxid. Helium dagegen hatte in-vivo einen supprimierenden Effekt auf das Tumorzellwachstum (40).

Diese Ergebnisse konnten in-vitro bestätigt werden (50). Die Inkubation der Zellen führte bei Kohlendioxid und bei Luft zu einer Steigerung des Tumorzellwachstums. Andere Studien dagegen fanden keinen stimulierenden Effekt von Kohlendioxid im Vergleich zur Kontrollgruppe (46).

Neben dem direkten Einfluss des Gases auf Tumorzellen scheint Kohlendioxid auch einen Einfluss auf die lokale und systemische Immunabwehr zu haben (55). Ein direkter Vergleich zwischen Laparoskopie und konventioneller Chirurgie hinsichtlich der lokalen immunologischen Abwehr von Tumorzellen wurde von Sietses und Cuesta durchgeführt (56). Im Vergleich zur Laparoskopie haben sie einen signifikanten Abfall zytotoxischer Reaktionen von Monozyten gegen Karzinomzellen nach Laparotomie dokumentieren können.

Neben dem insufflierten Gas zur Etablierung eines Pneumoperitoneums ist auch ein erhöhter intraabdomineller Druck erforderlich. Auch der intraabdominelle Druck scheint einen Einfluß auf das Wachstum von Tumorzellen zu haben. So wiesen Jacobi und Mitarbeiter in einem Rattenmodell nach, dass ein erhöhter intraabdomineller Druck mit einer Zunahme des intraperitonealen und subkutanen Tumorwachstums korreliert (47). Gutt et al. zeigten in einer in-vitro Studie, dass das Wachstum von Tumorzellen bei Kohlendioxid Inkubation und erhöhtem Druck zunächst kurzfristig supprimiert wird, anschließend aber im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein verstärktes Wachstum aufweist (104).

Ausgehend von den bisher gewonnenen Daten muß festgestellt werden, dass Kohlendioxid und der intraperitoneale Druck in den meisten in-vitro und in-vivo Untersuchungen einen eher fördernden Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen haben. Im Gegensatz dazu wird deutlich, dass Helium grundsätzlich eher keinen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen hat.

Trotz der bisher gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse bleiben jedoch eine Reihe substantieller Fragen unbeantwortet. Bisherige Experimente haben grundsätzlich Veränderungen des Tumorwachstums während und nach der Laparoskopie untersucht und beschrieben, Antworten auf möglichen Ursachen geben diese Untersuchungen nicht.

Laparoskopie bedeutet für Zellen „Stress“. Dieser „Zellstress“ bezieht sich nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf Peritonealzellen und immunologischen Zellen. Die im Rahmen der Laparoskopie vorkommenden Stressfaktoren sind extrem vielfältig und führen zu unterschiedlichen Belastungen der einzelnen Zellgruppen.

Unter den Stressfaktoren spielen mechanische Stressfaktoren wie Druck oder Scherkräfte, die durch das insufflierte Gas hervorgerufen werden, eine wichtige Rolle (94). Aber auch Temperatur- und Feuchtigkeitsveränderungen während der Laparoskopie sind Stressfaktoren für Zellen und könnten einen Einfluß auf Zellwachstum haben (105). Neben den mechanischen Belastungen führen chemische Veränderungen während der Laparoskopie zu Stresssituationen der betroffenen Zellgruppen. Grundsätzlich kommt es während der Laparoskopie zu Veränderungen des intra- und extrazellulären pH-Wertes (106). Daneben wird die zeitlich begrenzte Hypoxie für die Zelle als ein extremer Stressfaktor angesehen (107).

Diese Arbeit hat sich nun zur Aufgabe gemacht, den Einfluß dieser Stressfaktoren auf Tumorzellen und Peritonealzellen zu analysieren.

Die erste Frage bezieht sich auf die Beschaffenheit des Peritoneums nach einem laparoskopischen Eingriff. Könnte es sein, dass sich das Peritoneum während der Laparoskopie in seiner strukturellen Form soweit verändert, dass Tumorzellen nach Laparoskopie verbesserte intraperitoneale Wachstumsbedingungen vorfinden? Es ist bekannt, dass das Peritoneum als immunologische und mechanische Schutzebene innerhalb der Bauchhöhle dient (108). Wird sie zerstört, könnten Tumorzellen verbesserte Wachstumsbedingungen vorfinden. Eine Auflösung bzw. Unterbrechung der morphologischen Struktur des Peritoneums könnte eine Erklärung für ein verstärktes Tumorstadium nach Laparoskopie sein.

Eine zweite wichtige Frage bezieht sich auf molekularbiologische Veränderungen der Tumorzelle. Eine Ebene der molekularbiologischen Mechanismen der Zellen sind die der Adhäsionsmoleküle. Adhäsionsmoleküle haben eine wichtige Funktion nicht nur im Rahmen des Wachstumsverhalten von Tumorzellen. Es existieren eine ganze Reihe von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen (109). Je nach ihrer Expressionsdichte und ihrem Expressionsmuster wird die biologische Funktion von Zellen verändert (110). Es stellt sich somit die Frage, in wieweit die Laparoskopie mit

ihren Stressfaktoren Gas und Druck die Expression von Adhäsionsmoleküle verändert und somit das Wachstumsverhalten von Tumorzellen modifiziert.

Aber nicht nur hochkomplexen Mechanismen wie die der Adhäsionsmoleküle sind durch Gas und Druck möglicherweise modifizierbar. Auch „einfache“ intrazelluläre Regulationsmechanismen könnten durch die Laparoskopie verändert werden, so dass grundlegenden physiologische Zellmechanismen modifiziert werden.

Verschiebungen des intra- und extrazellulären pH-Wertes während der Laparoskopie führen möglicherweise zu Veränderungen des intrazellulären Elektrolythaushaltes. Kalzium zum Beispiel, ein wichtiges Signalmoleküle innerhalb der Zelle, könnte durch den Einfluß der Laparoskopie in seiner intrazellulären Konzentration verändert werden. Diese intrazellulären Verschiebungen von Elektrolyten wiederum hätte womöglich einen modifizierenden Einfluß auf das Zellwachstum selbst.

Somit wird aufgrund der oben genannten Überlegungen in dieser Arbeit folgende Fragen schwerpunktmäßig untersucht:

1. Hat das Pneumoperitoneum einen Einfluss auf die rasterelektronenmikroskopische Struktur des Peritoneums?
2. Hat das Pneumoperitoneum Einfluss auf die Adhäsionsmolekülexpression von Kolonkarzinomzellen (HT-29)?
3. Hat das Pneumoperitoneum Einfluss auf den intrazellulären Kalziumgehalt von Kolonkarzinomzellen (HT-29)?

## **5.1 Einfluß des Pneumoperitoneums auf die rasterelektronenmikroskopische Struktur des Peritoneums**

In unserer rasterelektronenmikroskopischen Tierstudie kann in beiden Gruppen (Kohlendioxid und Helium) keine signifikanten Veränderungen des strukturellen Aufbaues des Peritoneums gefunden werden. Weder ein Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid noch ein Pneumoperitoneum mit Helium für 30 Minuten ändert grundsätzlich den histologischen Aufbau des parietalen Peritoneums der Ratte. Bei jeweils 21 Tieren (84%) in jeder Gruppe, finden sich keine Veränderungen des Peritoneums. Nur insgesamt viermal wird in jeder Gruppe Veränderungen beobachtet und ein nicht intaktes Peritoneum diagnostiziert (16%). Im gesamten Zeitraum wird auch kein vermehrtes Tumorwachstum festgestellt. Vereinzelt lassen sich sogenannte Rundzellen diagnostizieren, von einer Peritonealkarzinose kann aber in keinem Fall gesprochen werden.

Die Ergebnisse unserer Tierstudie zeigen, dass ein Pneumoperitoneum in der Ratte keinen schädlichen Einfluß auf die Struktur des Peritoneums hat. Die Überlegung, dass eine veränderte Struktur des Pneumoperitoneums, hervorgerufen durch die Einflüsse der Laparoskopie, eine vermehrte Tumoradhäsion verursacht, kann durch unsere Daten nicht belegt werden.

Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kommen allerdings zu anderen Resultaten und stehen im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen. Es bedarf einer sorgfältigen Analyse und Bewertung dieser unterschiedlichen Ergebnisse.

Volz et al. zum Beispiel untersuchten rasterelektronenmikroskopisch das parietale Peritoneum von Mäusen nach Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid und dokumentierten in allen Tieren strukturelle Veränderungen des Peritoneums (94). Wurde den Mäusen intraperitoneal Tumorzellen (Melanomzellen) appliziert, so konnte ein gesteigertes Tumorwachstum im Sinne einer Peritonealkarzinose diagnostiziert werden. Die Kriterien zur Beurteilung der peritonealen Veränderungen sowie die Zeitpunkte der Probeentnahmen, das verwendete Gas und die Dauer des Eingriffs entsprachen unserer Studie.

Im Unterschied zu unserer Studie verwendete Volz et al. jedoch Mäuse als Versuchstiere und baute einen deutlich geringeren intraabdominellen Druck von nur 6 mmHg (15 mm Hg in unserer Arbeit) auf. Als weiteres wurden Melanomzellen injiziert und nicht Adenokarzinomzellen der Ratte.

Die Daten von Volz erscheinen jedoch eindeutig und deuten auf einen entscheidenden Einfluß des Pneumoperitoneums auf die Strukturveränderungen des Peritoneums hin. Die komplett unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu unseren Daten können durch drei Punkte möglicherweise erklärt werden.

Die Belastung und Schädigung des Peritoneums könnte nicht nur durch den intraperitonealen Druck hervorgerufen werden, sondern gegebenenfalls auch durch sogenannte Scherkräfte, die wiederum vom Flow des insufflierten Gases abhängig sind. In unserer Arbeit wurden 300 ml Gas pro Ratte und Versuch verbraucht. In der Arbeit von Volz gibt es dazu keine Angaben. Sicherlich scheint aber gerade dieser Faktor im Mausmodell und in der klinischen Praxis eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. Wie hoch der Verbrauch bzw. der Flow in den einzelnen Versuchsreihen war, ist aus der Arbeit nicht zu entnehmen.

Als weiteres könnten auch die unterschiedlichen Tiermodelle ein Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse sein, da das Mäuseperitoneum eine empfindlichere Struktur aufweist als das der Ratte, welches als relativ resistent gegenüber Noxen gilt. Schließlich wurde das Peritoneum in unserer Studie durch eine Lebendfixierung fixiert. Die Arbeit von Volz beschreibt zunächst eine Tötung der Mäusen mit einer Überdosis Ketanes mit anschließender Fixierung des Peritoneums. Auch hier könnte der methodischer Unterschied die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise erklären.

Eine weitere Publikation von Suematusu et al. aus dem Jahr 2001 beschreibt ebenfalls rasterelektronenmikroskopische Veränderungen nach Aufbau eines Pneumoperitoneums in einem Mausmodell (54). Diese rasterelektronenmikroskopische Veränderungen des Mesothels werden nicht nur nach Laparoskopie mit unterschiedlichen Gasen (CO<sub>2</sub>, Helium, Luft), sondern auch nach Laparotomie beschrieben. Diese Veränderungen verstärkten sich mit zunehmender Operationszeit (30 – 90 min) bzw. steigendem Insufflationsdruck (5 und 10 mmHg).

Wie in der Studie von Volz handelt es sich hier ebenfalls um ein Mausmodell. Auch in dieser Studie gibt es keine Angaben über den Verbrauch der verschiedenen Gase,

welches einen möglichen Einfluß des Flows beschreiben könnte. Die unterschiedlichen Veränderungen des Peritoneums in der Laparotomiegruppe und den Laparoskopiegruppen führt der Autor auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zurück. Die Verschlechterung der Befunde wird an der stärkeren Ausprägung der Interzellularspalten dokumentiert. Auf eine mögliche Freilegung der Basalmembran wird nicht eingegangen.

Ein weiterer entscheidender Unterschied zur den bisherigen Arbeiten ist die Tatsache, dass Suematsu et al das viszerale Peritoneum untersucht. Hier muß allerdings festgehalten werden, dass das viszerale Peritoneum durch kubische Zelle und tiefe Interzellularfurchen gekennzeichnet ist und einen unterschiedlichen Aufbau zum parietalen Peritoneum aufzeigt (108).

Eine Arbeit von Schaeff et al. untersucht elektronenmikroskopische Veränderungen des Peritoneums beim Menschen nach laparoskopischen und konventionellen Operationen (53). Dabei werden pathologische Veränderungen des Peritoneums während der ersten drei Stunden laparoskopischer Eingriffe beschrieben, die nach konventionellen Eingriffen nicht beschrieben werden. In dieser Arbeit wurden insgesamt 36 Biopsate entnommen und untersucht, die Anzahl der Patienten pro Gruppe und die Anzahl der Proben pro Patient erwähnen die Autoren nicht. Ob die beschriebenen Veränderungen des Peritoneums Folge der Grundkrankheit oder des Operationsverfahrens sein könnten, wird in der Arbeit nicht diskutiert. Eindeutige Aussagen über die Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf die Mesothelzellen können somit aus der Arbeit nicht abgeleitet werden.

Hazebroek et al. veröffentlichten 2002 in ihrer Studie ebenfalls Veränderungen des Peritoneums nach Pneumoperitoneum, welches für 120 Minuten angelegt wurde (105). Untersucht wurden die Einflüsse von kaltem, warmem, trockenem und feuchtem Insufflationsgas, sowie der Einfluss einer gaslosen Laparoskopie. In allen Gruppen kam es zu eindeutigen Veränderungen der morphologischen Struktur des Peritoneums. Die verschiedenen Parameter hatten dabei keinen unterschiedlichen Einfluß. Die Autoren gaben an, dass der Gasfluß bei ca. 300 ml pro Minute und Tier lag und somit extrem hoch. Das könnte wiederum erklären, warum bei allen Tieren diese doch eindeutigen strukturellen Veränderungen des Peritoneums diagnostiziert wurden. Es

muß auch darauf hingewiesen werden, dass das Pneumoperitoneum in dieser Studie viermal länger andauerte als in unserer Arbeit.

Eine der wenigen Arbeiten, deren Daten sich einigermaßen mit unseren Ergebnissen decken, ist die Arbeit von Bloechle et al. (111). In dieser Arbeit wurde bei Ratten eine Peritonitis durch Magenperforation induziert und im weiteren Verlauf eine Laparoskopie durchgeführt. Dabei konnte im Anschluß an das Pneumoperitoneum rasterelektronenmikroskopisch eindeutig die Zeichen einer Peritonitis beobachtet werden. In der Kontrollgruppe, die lediglich einem Pneumoperitoneum unterzogen wurden, zeigte sich während des Eingriffs und bis zu 12 h später ein intaktes Mesothel. Die beschriebenen Lageveränderungen der Mikrovilli (flach liegend oder aufgerichtet) und die Faltenbildung des Bauchfells entsprechen am ehesten Artefakten und werden in der Literatur nicht als wesentliches Kriterium zur Diagnose einer Peritonitis herangezogen und sind daher nicht als relevante Veränderung anzusehen.

Insgesamt müssen die in der Literatur zum Teil sehr widersprüchlichen Daten auf Grund der sehr unterschiedlichen Untersuchungskriterien und Methoden sehr kritisch hinterfragt und interpretiert werden.

Eine Ursache der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse wird in systematischen Unterschieden der einzelnen Versuche liegen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten in Abhängigkeit von Insufflationsgas, -druck, und -fluss, aber auch in der Zusammensetzung der Tumorzellsuspensionen und der Fixierungslösungen liegen.

Angaben über den Gasfluss und -verbrauch fehlen in den meisten Studien. In unserem Versuch wurde ein maximaler Gasfluss von 0,3 l Gas / 30 min /Tier verbraucht. In Betracht gezogen wurde dieser Faktor bisher nur zur Erklärung der Tumorzellausbreitung innerhalb der Bauchhöhle als sogenannter Chimmney-Effekt (112). Weiterhin könnte ein hoher CO<sub>2</sub>-Gasfluss die mit dem Kapnoperitoneum verbundene Phänomene Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose verstärken und somit zu einer Schädigung des Bauchfells führen.

Zusammenfassend zeigt unsere rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Peritoneums, dass das Peritoneum nach Anlage eines Pneumoperitoneums in seinem histologischen Aufbau erhalten bleibt.

Dieses Ergebnisse steht zwar im Gegensatz zu anderen Studien über die Morphologie des Bauchfells nach Pneumoperitoneum, dieser Widerspruch könnte aber z.B. durch das verwendeten Tiermodell, die applizierten Tumorzelllinien oder den unterschiedlichen Gasfluss erklärt werden.

## **5.2 Einfluß des Pneumoperitoneums auf die Adhäsionsmolekülexpression von Kolonkarzinomzellen (HT-29)**

Über den Einfluß des Pneumoperitoneums im Rahmen der Laparoskopie auf die Expression von Adhäsionsmolekülen ist in der Literatur bisher nur wenig bekannt. Überhaupt ist das Wissen über die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen noch recht gering, obwohl das Verständnis über einzelne Zellmechanismen in Zusammenhang mit Adhäsionsmolekülen zunehmend in den Vordergrund der Zellforschung rückt. Die Wirkungsweise verschiedener Adhäsionsmoleküle spielt bei einer Vielzahl von biologischen Zellphänomenen eine zentrale Rolle. So ist die Embryogenese, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und Zellbewegung von Adhäsionsmolekülen entscheidend beeinflusst (113-116).

Adhäsionsmoleküle sind aber auch an pathophysiologischen Mechanismen von Zellen beteiligt und haben z.B. bei Tumorzellen eine regulatorische Funktion (109,117-119). Jedoch sind die Mechanismen der Tumormetastasierung bzw. das Wachstum von Tumoren bisher nur partiell verstanden. Die Frage nach der Funktion der Adhäsionsmoleküle in der Tumorforschung ist Thema intensiver Forschungsarbeiten. Bekannt ist, dass eine ganze Reihe von Adhäsionsmolekülen besonders in der Entwicklung von Metastasen, der Neovaskularisation, der Invasion und Penetration in Blutgefäße eine wichtige Rolle einnehmen. Relativ gut untersuchte Adhäsionsmoleküle sind das E-Cadherin, CD44v6, CD54 (ICAM-1) und das CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) (117-124). Je nach Expressionsintensität der einzelnen Adhäsionsmoleküle, die auf bestimmte Signale herauf und herunter geregelt werden, ändert sich auch das physiologische und pathophysiologische Verhalten von Zellen.

Welchen Einfluß nun die Laparoskopie bzw. das Pneumoperitoneum auf die Expressionsintensität von Adhäsionsmoleküle hat, ist so gut wie nicht bekannt. Somit könnte die Analyse von Adhäsionsmoleküle ein Schlüssel im Verständnis von Tumorwachstum während und nach der Laparoskopie sein.

Aus diesem Grunde haben wir in unserer in-vitro Studie Tumorzellen (HT-29) auf ihre Expression der oben genannten Adhäsionsmolekülen in Abhängigkeit von verschiedenen Insufflationsgasen und Insufflationsdrücken analysiert.

Zunächst untersuchten wir unbehandelte HT-29 Zellen auf die Expression von E-Cadherin, CD44v6, CD54 und CD29. Dabei konnte die FACS Analysen zeigen, dass HT-29 Zellen alle vier genannten Adhäsionsmoleküle (E-Cadherin, CD44v6, CD54 und CD29) in unterschiedlichem Ausmaß auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Es wird deutlich, dass die einzelnen Adhäsionsmoleküle eine recht unterschiedliche Expressionsintensität aufweisen.

Weiterhin zeigt sich, dass die einzelnen Adhäsionsmoleküle eine unterschiedliche Streubreiten innerhalb der Expression aufweisen. Besonders das Adhäsionsmolekül CD29 ( $\beta$ 1-Integrin) zeigt zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich starke Expressionsintensitäten. Im Gegensatz dazu werden E-Cadherin, CD44v6 und CD54 (ICAM-1) weniger stark exprimiert, zeigen dabei jedoch auch eine geringere Streubreite.

Die Tatsache der relativ großen Streubreite der Expressionsintensität ist nicht ganz unerheblich für die Messungen inkubierter bzw. behandelter Zellen. Zum Ausschluß der relativ starken Schwankung wurden zu jeder Messung eine Kontrollmessung von unbehandelten Zellen durchgeführt. Von der Expression der behandelten Zellen wurde die Expression der unbehandelten Zellen abgezogen.

Somit ist es möglich Schwankungen innerhalb der Zelle auszuschließen und die Auswirkungen der verschiedenen Gase und Drücke isoliert zu betrachten. Diese Form der Analyse ist für die Interpretation der Daten von entscheidender Bedeutung und wird in der folgenden Diskussion der Ergebnisse mit berücksichtigt.

### 5.2.1 E-Cadherin

Das Expressionsverhalten von E-Cadherin auf HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit Kohlendioxid bzw. Helium bei 10 bzw. 20 mmHg und nach 30 minütiger Inkubation in saurem (pH 6,4) bzw. basischen Medium (pH 8,2) wird analysiert. Dabei zeigt sich, dass die Expression von E-Cadherin unmittelbar nach Inkubation mit Kohlendioxid und 10 mmHg herunterreguliert wird. Dieser Abfall verstärkt sich bis 12 Stunden nach Inkubation. Anschließend normalisiert sich die Expression von E-Cadherin auf den Ausgangswert. Interessanterweise verändert sich die Expression von E-Cadherin nach 30 minütiger Inkubation mit Kohlendioxid bei 20 mmHg nicht. Es kommt zwar auch, ähnlich wie bei 10 mmHg, zunächst zu einem diskreten Abfall der Expression und anschließenden erneuten Anstieg der Expression, der Verlauf insgesamt zeigt allerdings keinen signifikanten Unterschied.

Die Inkubation der HT-29 Zellen in Helium führt zu keiner Veränderung der Expression von E-Cadherin, weder bei 10 noch bei 20 mmHg. Auch gibt es keine Veränderungen der Expression nach Inkubation der Tumorzellen für 30 Minuten in saurem bzw. basischen Medium.

Cadherine gehören strukturell zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie, einer Gruppe von transmembranösen Glykoproteinen. Cadherine sind in mehr als 10 Untergruppen unterteilt, die entsprechend unterschiedlicher immunologischer Charakteristika und Gewebeverteilung differenziert werden (124). Cadherine sind an den für jede Subklasse spezifischen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt, die eine wesentliche Rolle bei der selektiven Zelladhäsion während unterschiedlicher Entwicklungsphasen der jeweiligen Gewebe spielen (115). Die Inaktivierung von Cadherinen verursacht die Unterbrechung von Zell-Zell-Adhäsionen, wohingegen ihre Überexpression zu stabileren Zell-Zell-Kontakten führt. Eine verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin würde zu einer Zerstörung von Zell-Zell-Adhäsionen führen und somit infiltratives Wachstum begünstigen (125).

Die Expression von E-Cadherin ist bei schlecht differenzierten Kolonkarzinomen wie auch bei Karzinomen anderer Organe herunterreguliert (126). Eine Analyse der Expression auf kolorektalen Tumoren hat gezeigt, dass E-Cadherin als unabhängiger Prognosefaktor infrage kommen könnte (127). Mohri beschreibt in diesem

Zusammenhang, dass der Verlust oder die heterogene Expression von E-Cadherin in kolorektalen Karzinomen eng mit folgenden Parametern korreliert (120):

1. fortgeschrittenes klinisches Stadium
2. fortgeschrittene Tumorpenetration
3. undifferenzierte Tumorhistologie
4. ausgedehnter Lymphknotenbefall
5. Lebermetastasierung
6. Penetration in Lymphgefäße und venöser Einbruch

Insgesamt scheint eine signifikante Korrelation zwischen reduzierter Expression von E-Cadherin und dem Differenzierungsverlust kolorektaler Karzinome zu bestehen.

In unserer Arbeit deutet sich an, dass nur Kohlendioxid einen signifikanten Einfluß auf die Expression von E-Cadherin hat, Helium dagegen keinen. Der Druck selbst scheint in unserer Versuchsreihe eher keinen Einfluß auf die Expression von E-Cadherin zu haben. Auch die kurzfristige pH-Änderung des Mediums führt zu keiner Veränderung der Expressionsintensität von E-Cadherin.

Im Gegensatz zu unserer Arbeit, beschreibt die Arbeit von Kim et al. unmittelbar nach Inkubation mit Kohlendioxid einen signifikanten Anstieg der Expression von E-Cadherin (128). Obwohl diese Messungen an anderen Tumorzellreihen durchgeführt wurden (CX-2 und CC531) als in unserer Arbeit, muß festgestellt werden, dass die Interpretation dieser Ergebnisse einen entscheidenden Schwachpunkt aufweist. Kim et al. gehen bei jeder Messung immer nur von einem Kontrollwert unbehandelter Zellen aus. Um einen korrekten Vergleich der Werte zu erhalten, ist jedoch ein mit jeder Messung durchzuführender Kontrollwert unbehandelter Zellen erforderlich. Wie unsere Messungen unbehandelter Zellen zeigen, ist die Streubreite der Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle groß. Diese Streuvariante wird in der Arbeit von Kim et al. jedoch nicht berücksichtigt. Somit beschreibt diese Arbeitsgruppe einen signifikanten Anstieg von E-Cadherin nach Inkubation mit Kohlendioxid. Ein Anstieg der Expression nach Kohlendioxidinkubation wäre für das Metastasierungsverhalten von Karzinomzellen eher günstig, da eine verstärkte Expression von E-Cadherin die Adhäsion von Zellen untereinander verstärkt und somit die Möglichkeit einer Metastasierung reduzieren würde.

Ebenfalls einen Abfall der Expression von E-Cadherin auf Tumorzellen nach Inkubation mit Kohlendioxid beschreibt eine Arbeit von Kai-Lin Cai et al. (129). Sie untersuchten die Expression von E-Cadherin nach unterschiedlich langer Inkubation von CCL-228 Tumorzellen in Kohlendioxid und Stickstoff. Der Abfall der Expression von E-Cadherin nach Kohlendioxid-Inkubation war signifikant stärker als nach Stickstoff-Inkubation. Ähnlich wie in unserer Arbeit wird die Auswirkung von zwei verschiedenen Gasen untersucht. Auch in dieser Arbeit scheint Kohlendioxid einen stärkeren Einfluß auf die Expression von E-Cadherin zu haben als Helium bzw. Stickstoff.

Unsere Arbeit beschreibt einen diskreten Abfall der Expression. Obwohl diese Beobachtung marginal sind, könnten sie das verstärkte Tumorwachstum bei Kohlendioxid in den zahlreichen Rattenversuchen erklären, da die verminderte Expression von E-Cadherin das Metastasierungspotential von Tumorzellen erhöht (120,126-127). Die Inkubation in Helium dagegen zeigt keine Veränderung der Expression von E-Cadherin, sowohl bei 10 als auch bei 20 mmHg. Dies entspräche ebenfalls den Ergebnissen verschiedener in-vivo Versuchen, die zeigen konnten, dass Helium keinen Einfluß auf Tumorwachstum hat (40).

Da der Einfluß von pH-Werten des Medium für Zellen nicht unerheblich ist und Kohlendioxid zu einer deutlichen Reduzierung des pH-Wertes führt, könnte ein kurzfristig veränderter pH-Wert des Medium die Expression von E-Cadherin soweit modifizieren, dass sich ein verändertes Wachstumsverhalten von Tumorzellen ergibt. Aber auch diese Messungen ergaben keine signifikanten Veränderungen der Expression von E-Cadherin. Der pH-Wert scheint somit keinen Einfluß auf die Expression von E-Cadherin zu haben. In der Literatur lassen sich kaum Arbeiten finden, die die Auswirkung von pH-Änderungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen untersuchen.

Gewebsazidose allgemein ist hauptsächlich bei Minderperfusion und Ischämie vorhanden. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Azidose zu einer Stimulation der Expression von Adhäsionsmoleküle führen (130). Für E-Cadherin gibt es diesbezüglich bisher allerdings keine Daten.

### 5.2.2 CD44v6

Ähnlich wie die Untersuchungen mit E-Cadherin führt die Inkubation von HT-29 Zellen mit Kohlendioxid ebenfalls zu einer Reduktion der Expression von CD44v6. Nach 30 minütiger Inkubation mit Kohlendioxid bei 10 mmHg kommt es zunächst zu keiner Veränderung der Expression, dann erfolgt allerdings eine Expressionsreduktion, die sich bis 24 Stunden nach Inkubation verstärkt und nach 48 Stunden wieder normalisiert. Aufgrund der großen Streubreite zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied im Expressionsverlauf. Im Vergleich zu 10 mmHg Kohlendioxidinkubation ist die Streubreite bei 20 mmHg in der Expression deutlich geringer. Auch hier kommt es zu einem Abfall der Expression von CD44v6, der sich ebenfalls nach 48 Stunden wieder normalisiert. Dieser Unterschied ist diesmal signifikant unterschiedlich. Kohlendioxid scheint somit bei erhöhtem Druck (20 mmHg) einen Einfluß auf die Expression von CD44v6 zu haben.

Dagegen zeigt die Expression von CD44v6 bei der Inkubation mit Helium und einem Druck von 10 bzw. 20 mmHg keine signifikanten Unterschiede. Die Expressionsergebnisse schwanken um den Ausgangswert. Der Druck alleine führt also zu keinen signifikanten Veränderungen bei der Expression von CD44v6.

Ähnlich verhält es sich mit der Expression von CD44v6 bei veränderten pH-Werten. Sowohl ein pH-Wert von 6,4 als auch ein pH-Wert von 8,2 für 30 Minuten führt zu keinen signifikanten Schwankungen der Expression von CD44v6. Somit wird die Expression von CD44v6 auf HT-29 Zellen grundsätzlich nur durch Kohlendioxid und nicht durch Helium beeinflusst.

Das Zelladhäsionsmolekül CD44, ein weit verbreiteter transmembranöser Hyaluronat Rezeptor, wird von Tumorzellen exprimiert und korreliert positiv mit der Tumormetastasierung bei Magen-, Darm-, Mamma- und Pankreascarcinomen. CD44 wird als wesentlicher Faktor der Tumorinvasivität und Angiogenese angesehen. (116). Die Ergebnisse verschiedener Studien zum prognostischen Wert von CD44v6 variieren. So fanden z.B. Cappola et al (131) keine Zusammenhänge zu Tumortyp, Stadium und Überleben der Patienten. Dagegen berichten andere Untersuchungen signifikante Korrelationen von CD44v6 Expression zu Dukes Stadium, Metastasierung und Überlebensrate (132). Dagegen berichten andere Publikationen von signifikanten

Korrelationen zwischen CD44v6 und Dukes Stadium bzw. Metastasierung und Überlebensrate (132).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass hauptsächlich Kohlendioxid einen Einfluß auf die Expression von CD44v6 hat und die Expressionsintensität senkt. Helium dagegen hat keinen Einfluß auf die Expression.

Die Arbeit von Kim et al. beschreibt im Gegensatz zu unserer Arbeit einen Anstieg der CD44v6 Expression auf einer Tumorzelle nach Inkubation mit Kohlendioxid (128). Ähnlich wie bei E-Cadherin gehen die Untersucher auch hier bei jeder Messung immer nur von einem Kontrollwert unbehandelter Zellen aus, so dass die Ergebnisse eher mit Skepsis betrachtet werden müssen. Um einen korrekten Vergleich der Werte zu erhalten, ist ein mit jeder Messung durchzuführender Kontrollwert unbehandelter Zellen erforderlich. Somit kann der Einfluß der relativ großen Streubreite der Expression ausgeschlossen werden.

Sollte die Expression von CD44v6 tatsächlich stimuliert werden, so würden diese Beobachtungen eher eine verstärkte Metastasierung von Tumorzellen erklären (70). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass das CD44v6 kausal an Metastasierungs-geschehen beteiligt ist (70). Weiter konnte gezeigt werden, dass bei kolorektalen Karzinomen die CD44v6 Expression im wesentlichen auf die fortgeschrittenen Stadien beschränkt ist und häufiger in metastasierten als in nicht metastasierten Karzinomen nachweisbar ist (71).

Unsere Ergebnisse sprechen eher für eine verminderte Metastasierung von Kolonkarzinomzellen nach Kohlendioxidinkubation, da die Expressionintensität der Splice-Variante CD44v6 auf HT-29 Zellen tendenziell abnimmt als das die Expression stimuliert wird.

Eine Arbeit von Leister et al. beschreibt in einem in-vivo Versuch mit immuninkompetenten Mäusen keine signifikanten Änderungen der Expression von CD44v6 in Tumorgewebe zwischen laparotomierten, laparoskopierten und einer Kontrollgruppe (133). Dafür steigt die Expression des Adhäsionsmoleküls CD44v5 signifikant in der Laparoskopiegruppe im Vergleich zur Laparotomie- und Kontrollgruppe an. CD44v5 ist eine Splicevariante von CD44s und wird ebenfalls auf Tumorzellen verstärkt expremiert. Die Autoren schließen daraus, dass die Laparoskopie einen stärkeren Einfluß auf die Expression von Adhäsionsmolekülen hat, als die Laparotomie.

Insgesamt zeigen alle Arbeiten keine einheitlichen Ergebnisse, klar jedoch erscheint die Tatsache, dass Kohlendioxid und nicht Helium einen Einfluß auf die Expression hat.

Keinen Einfluß auf die Expression von CD44v6 hat der pH-Wert. In der Literatur lassen sich keine Arbeiten finden, die den Einfluß des pH-Wertes auf die Expression von CD44 untersuchen.

### **5.2.3 CD54 (ICAM-1)**

In unserer Versuchsreihe kommt es 1 bzw. 12 Stunden nach Inkubation mit Kohlendioxid bei einem Druck von 10 mmHg zu keiner veränderten Expression von ICAM-1 auf HT-29 Zellen. 24 Stunden später folgt ein Anstieg der Expression. Die Expression fällt dann aber wieder ab. Der Verlauf ist nicht signifikant.

Dagegen führt ein Inkubationsdruck von 20 mmHg zu einem direkten Anstieg der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf HT-29 Zellen. Im weiteren Verlauf fällt die Expression von ICAM-1 wieder ab und ist am 4. Tag nach Inkubation deutlich vermindert. Der Verlauf der Expression ist signifikant unterschiedlich.

Ähnlich wie bei der Expression von E-Cadherin und CD44v6 führt die 30 minütige Inkubation von HT-29 mit Helium und einem Druck von 10 bzw. 20 mmHg zu keinen signifikanten Unterschieden in der Expression von ICAM-1. Ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen des Expressionsverhalten kommt es nach Inkubation der Zellen in saurem bzw. basischen Medium.

Die Ergebnisse deuten auch hier wieder an, dass Kohlendioxid einen stärkeren Einfluß auf die Expression von ICAM-1 hat als Helium. Kohlendioxid führt zunächst zu einem Anstieg, dann jedoch zu einer Verminderung der ICAM-1 Expression.

Welche Bedeutung dies wiederum auf die Metastasierungseigenschaften von Karzinomzellen haben kann, ist fraglich. ICAM-1 scheint für die Metastasierung von eher untergeordneter Bedeutung zu sein (134). Andererseits ist bekannt, dass die Prognose menschlicher Melanome mit der Expression von ICAM-1 assoziiert ist (134). Tumoren mit höherer ICAM-1 Expression haben einen günstigeren Verlauf, möglicherweise weil sie von LFA-1 positiven immunkompetenten Zellen über einen ICAM-1/LFA-I Interaktion besser erkannt werden (135).

Insgesamt scheinen ICAM-1 Zelladhäsionsmoleküle weitreichende Funktionen zu haben und an einer Anzahl von Zell-Interaktionen teilzunehmen (136). Es wird davon ausgegangen, dass nach Anheftung von Tumorzellen an unterschiedlichen Geweben durch Infiltration und Destruktion Gewebebarrieren überwunden werden und somit eine Aussaat im Gewebe oder der Lymph- bzw. Blutbahn möglich wird. Hierbei nimmt das Adhäsionsmolekül ICAM-1 eine zentrale Rolle ein (136).

Der Einfluß von Kohlendioxid und Druck auf die Expression von ICAM-1 ist bisher ebenfalls kaum untersucht worden. Die Arbeit von Kim et al. beschreibt einen signifikanten Anstieg der Expression von ICAM-1 nach Kohlendioxid-Inkubation von Tumorzellen (128). Diese Ergebnisse entsprechen unseren Ergebnissen, jedoch gehen auch diese Werte erneut von nur einem Kontrollwert aus.

Zünd et al. konnten eine erhöhte Induktion von ICAM-1 auf Endothelzellen beschreiben, allerdings durch Hypoxie hervorgerufen (137). Hypoxie als Stressfaktor für die Zelle erleiden nicht nur die Kohlendioxid inkubierten Zellen, auch Zellen die mit Helium inkubiert wurden, befinden sich in einer 30 minütigen Phase der Hypoxie. Allerdings konnten hier keine signifikanten Veränderungen der Expression von ICAM-1 festgestellt werden.

Eine Arbeit von Serrano et al. beschreibt eine verminderte Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen nach Kohlendioxidinkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe (138).

Insgesamt macht die Analyse der in unserer Arbeit gewonnenen Daten erneut deutlich, dass Kohlendioxid der einzigste Faktor ist, der einen Einfluß auf die Expression von ICAM-1 hat. Weder Helium noch der pH-Wert scheinen die Expressionsintensität von ICAM-1 auf HT-29 Zellen zu beeinflussen.

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

In unserer Analyse zeigt sich eine hohe Streubreite der Expression von  $\beta$ 1-Integrin. Die Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid bei einem Druck von 10 mmHg führt zu keinen signifikanten Veränderungen der Expression.

Unmittelbar nach Inkubation der HT-29 Zellen mit Kohlendioxid bei einem Druck von 20 mmHg kommt es zu einer deutlichen verminderten Expression des Adhäsionsmoleküls  $\beta$ 1-Integrin auf den Adenokarzinomzellen. Die Reduktion der Expression verstärkt sich in den Folgestunden und hält bis zum 2. Tag nach der Inkubation an. Im weiteren Verlauf zeigt sich ein erneuter Anstieg der Expression des Adhäsionsmoleküls  $\beta$ 1-Integrin und kehrt am 4. Tag nach Inkubation zum Ausgangswert wieder zurück. Die Verlauf der unterschiedlichen Expression ist hoch signifikant.

Der Verlauf der Expression des Adhäsionsmoleküls  $\beta$ 1-Integrin nach Inkubation mit Helium bei einem Inkubationsdruck von 10 mmHg zeigt zunächst eine gering erhöhte Expression, um dann nach 48 Stunden wieder abzufallen und am 4. Tag nach Inkubation wieder im Ausgangsbereich zu liegen. Der Unterschied ist signifikant. Die Veränderungen sind allerdings im Vergleich zu den Expressionswerten nach Kohlendioxidinkubation geringer.

Auch bei der Inkubation mit Helium und 20 mmHg kommt es unmittelbar nach Inkubation zu einem Abfall der Expression von  $\beta$ 1-Integrin auf den HT-29 Karzinomzellen. Die verminderte Expression hält bis zum 2. Tag nach Inkubation an, um dann erneut anzusteigen. Am 4. Tag nach Inkubation steigt die Expression des Adhäsionsmoleküls  $\beta$ 1-Integrin stark an. Der gesamten Verlauf ist signifikant.

Die Inkubation in saurem bzw. basischen Medium führt zu keinen veränderten Expressionen von  $\beta$ 1-Integrin.

Im Vergleich zu den bisher genannte Adhäsionsmolekülen E-Cadherin, CD44-v6 und ICAM-1 scheint besonders das  $\beta$ 1-Integrin durch die Inkubation von Kohlendioxid und Helium modifiziert zu werden. Auffallend in dieser Messreihe ist jedoch auch die verstärkte Reaktion der Expression auf Helium und auch auf Druck.

$\beta$ 1-Integrine sind heterodimere, transmembranöse Adhäsionsmoleküle, die vor allem Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix vermitteln. Es sind mehr als 20 verschiedene Integrinheterodimere bekannt, von denen  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3 Integrine die wichtigsten Moleküle dieser Familie zu sein scheinen, die auf Tumorzellen exprimiert werden (121).

Studien haben Korrelationen zwischen der Organpräferenz der Organmetastasierung und in-vitro-Adhäsionsverhalten maligner Zellen an extrazellulärer Matrix verschiedener Ursprungsorgane demonstriert (139,140,141). Beim Vergleich kolorektaler Lebermetastasen mit ihren Primärtumoren wurden im wesentlichen vergleichbare Expressionsmuster von Integrinen beschrieben. In verschiedenen Studien wurden die Expressionsmuster von Integrinen in normalen Geweben mit dem verschiedenen Stadien von kolorektalen Karzinomen verglichen (142,143).

Generell zeigte sich dabei eine hohe Variabilität der Integrinexpression, die zum Differenzierungsgrad des Primärtumors in Verbindung zu stehen scheint (144).

Die bisherigen Studien über Integrinexpression und deren prognostische Relevanz sind sehr heterogen und erschweren eine Bewertung hinsichtlich der potenziellen Nutzbarkeit.

Die in der Literatur beschriebenen Variabilität der Integrinexpression entspricht auch unseren Ergebnissen und machen somit eine Analyse der Ergebnisse um so schwieriger.

Interessanterweise konnte eine Arbeit von Basson et al. zeigen, dass ein erhöhter Druck (15mmHg) eine Adhäsionsteigerung von unterschiedlichen Kolonkarzinomzelllinien bewirkte, welche  $\beta 1$ -Integrin vermittelt zu sein scheint (145). Wurden die  $\beta 1$ -Integrine geblockt, so war die gesteigerte Adhäsion, welche durch erhöhte Drücke hervorgerufen wurde, wieder verringert. Diese Arbeit ist eine der wenigen Arbeiten, die zeigen konnte, dass atmosphärischer Druck auf Zellen einen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen haben kann. Bisher ist nur bekannt, dass Druck zu erhöhten Proliferationsrate von Zellen führen kann (146,147). In wieweit diese Proliferationssteigerung durch Adhäsionsmoleküle reguliert wird, ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen die Integrine dabei eine nicht unerhebliche Rolle.

Einen Einfluß verschiedener pH-Werte auf die Expression von  $\beta 1$ -Integrin finden wir in unserer Arbeit nicht. Auch in der Literatur lassen sich keine Hinweise finden, dass  $\beta 1$ -Integrin durch pH-Werte modifiziert werden könnte.

Insgesamt zeigen sich für alle vier untersuchten Adhäsionsmoleküle nach Inkubation mit Kohlendioxid und Helium ein relativ einheitliches Bild. Zunächst wird deutlich, dass die Inkubation mit Kohlendioxid einen stärkeren Einfluss auf die Expression der einzelnen Adhäsionsmoleküle hat, als die Inkubation mit Helium. Helium führt weder bei E-Cadherin, noch bei CD44v6, noch bei ICAM-1 zu einer signifikant veränderten Expression. Einzig und allein die Analyse der Expression von  $\beta 1$ -Integrin zeigt eine

signifikante Veränderung der Expression nicht nur durch Kohlendioxid sondern auch durch das Gas Helium.

Deutlich wird weiterhin, dass durch die Inkubation mit Kohlendioxid die Expression von E-Cadherin, CD44v5 und ICAM-1 auf HT-29 eher herunter reguliert wird. Auch wenn diese Unterschiede statistisch eher gering erscheinen, könnten diese Ergebnisse eine mögliche Erklärung sein, warum es in den in-vitro und in-vivo Experimenten gerade bei Kohlendioxid zu einem vermehrten Tumorwachstum kommt und Helium keinen Einfluss auf die Tumorzellen hat. Allerdings muß auch hier berücksichtigt werden, dass die verminderte Expression der genannten Adhäsionsmoleküle zu unterschiedlichen Interpretationen einer möglichen Modifizierung des Metastasierungsverhalten von Tumorzellen führt.

Eine verminderte Expression von E-Cadherin führt zu einer Auflösung von Zellverbänden und ermöglicht somit Tumorzellen eher zu metastasieren (120). In unserem Experiment führt Kohlendioxid zu einer verminderten Expression von E-Cadherin. Somit könnten diese Beobachtungen eine mögliche Erklärung für ein verstärktes Tumorwachstum in der Laparoskopie sein. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse einen Einfluß von Kohlendioxid auf die Expression nur bei 10 mmHg und nicht bei 20 mmHg. Druck scheint somit in diese Versuchsreihe eher keine Rolle zu spielen. Helium dagegen hat keinen Einfluß auf die Expression von E-Cadherin. Auch dieses Ergebnis ist mit den Ergebnissen der in-vivo und in-vitro Untersuchungen mit Tumorzellen vereinbar.

Dagegen sprechen allerdings die Daten der CD44v6 Expression. Die Analyse ergibt ebenfalls eine Reduzierung der Expression nach Inkubation mit Kohlendioxid. Untersuchungen zeigen, dass bei fortgeschrittenen Kzinomen eine erhöhte Expression von CD44v6 zu finden sei (131) und CD44v6 im wesentlichen für die Angiogenese und Tumorinfiltration verantwortlich ist (132). Sollte die Kohlendioxidinkubation jedoch zu einer verminderten Expression von CD44v6 führen, so würden diese Ergebnisse gegen eine Verstärkung der Metastasierung nach Kohlendioxidinkubation sprechen. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass der Verlust der Expression von CD44v6 mit einer schlechteren Prognose von Kzinomen verbunden ist (132).

Ähnlich wie die Expressionsveränderungen von E-Cadherin und CD44v6 führt die Inkubation mit Kohlendioxid grundsätzlich zu einem Abfall der Expression von ICAM-1. Helium dagegen hat keinen Einfluß auf die Expression. Obwohl das Expressionsverhalten von ICAM-1 im Rahmen von Tumorwachstum und Metastasierung grundsätzlich noch nicht verstanden ist, geht man davon aus, dass eine erhöhte Expression prognostisch günstiger ist (135). Wie unsere Ergebnisse allerdings zeigen, scheint auch hier Kohlendioxid einen eher negativen Einfluß zu haben.

$\beta$ 1-Integrin dagegen spielt im Vergleich zu den drei oben genannten Adhäsionsmolekülen eine gesonderte Rolle, da das Expressionsverhalten von  $\beta$ 1-Integrin auch durch Helium verändert wird. Sowohl Kohlendioxid als auch Helium senken die Expressionsdichte von  $\beta$ 1-Integrin. Da Integrine eine hohe Validität in ihrer Expression zeigen ist eine Interpretation der gewonnenen Daten jedoch recht schwierig. Über mögliche prognostische Aussagen kann aufgrund der Modifizierung der Expression von  $\beta$ 1-Integrin sowohl nach Kohlendioxid und Helium keine Aussage gemacht werden.

Es gibt jedoch Hinweise, dass die  $\beta$ 1-Integrin Expression durch Druck modifiziert werden könnte und somit das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen beeinflusst (145). Somit hätte auch Helium einen direkten Einfluß auf die Expression dieses Adhäsionsmoleküls. Hinweise, ob Druck auch andere Adhäsionsmoleküle in ihrem Expressionsverhalten beeinflusst, läßt sich bisher nicht nachweisen.

Es gibt jedoch Daten, dass Druck die Proliferationsrate von Zellen beeinflusst. So ist bekannt, daß erhöhte Drücke (40 – 120 mmHg) die Proliferation von Epithelien stimuliert (146). Eine Studie konnte zeigen, dass ein erhöhter Druck in den Gallenwegen die Proliferation von Gallenepithelien stimuliert (147). Gutt et al. konnte einen positiven Zusammenhang zwischen positivem Druck und Tumorwachstum sehen (104). Ähnliche Beobachtungen machten Jacobi und Mitarbeiter (47).

Insgesamt kann ein Zusammenhang zwischen dem Zellstressfaktor Druck und Zellwachstum gesehen werden. Im Rahmen der Adhäsionsmoleküle kann allerdings nur das Adhäsionsmolekül  $\beta$ 1-Integrin als ein durch Druck und Gas modifiziertes Adhäsionsmolekül angesehen werden.

Neben dem Zellstress Druck muß in der Interpretation der Daten auch der Zellstressfaktor Hypoxie beachtet werden. Die Tumorzellen sind einer extremen Hypoxiephase ausgesetzt, solange die Inkubation andauert. Kohlendioxid und Helium führen während der Inkubation beide zu einer Hypoxie. Dieser 30 minütige Zellstress führt nicht zum Tod der Zelle. Zellen überleben nicht nur diese Phase, es gibt Hinweise, dass ein Teil dieser Zellen dadurch einen Wachstumsschub erfährt. Da beide Gase, Kohlendioxid und auch Helium, zu einer Hypoxie führen, müssten beide Gase zu einer ähnlichen Modifikationen der Expression von Adhäsionsmolekülen führen. Diese Vermutung konnten wir allerdings nicht bestätigen. Die Phase der Hypoxie bei Heliuminkubation führt außer bei der  $\beta$ 1-Integrin Expression zu keinen signifikanten Veränderungen bzw. Modifikation der Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese Ergebnisse entsprechen den in-vitro Beobachtungen von Maurus et al. (148). Sie konnten zeigen, dass Hypoxie zu keiner veränderten Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen führt. Wurden allerdings inflammatorischen Interleukine hinzu geführt, kam es zu einer verminderten Expression von ICAM-1.

Ein weiterer Stressfaktor, der die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflussen kann, sind pH-Verschiebungen im Sinne einer Azidose. Eine 30 minütige Inkubation mit Kohlendioxid führt in der Regel zu einem Abfall des pH-Wertes des Zellmediums auf ca. 6,2 (106). Ähnliche Ergebnisse ergaben in-vivo Versuche (149). Die massiven Veränderungen des pH-Wertes lassen sich nach Helium Inkubation nicht nachweisen. Das im Medium gut lösliche Kohlendioxid reagiert mit Wasser zu  $H^+$  und  $HCO_3^-$ . Ein Teil der  $H^+$  wird abgepuffert, der größte Teil führt allerdings zu einem Abfall des pH-Wertes und somit zur Azidose.

In-vivo konnten in einer Studie von Kuntz et al. signifikante Unterschiede der pH-Werte in der Abdominalhöhle, im Blut und an den subkutanen Inzisionen nach einer Laparoskopie mit Kohlendioxid im Vergleich zu Helium, Xenon, Luft und  $N_2O$  nachgewiesen werden (149). Hierbei fiel der pH-Wert im Blut nur leicht ab, während eine ausgeprägte Azidose in der Peritonealflüssigkeit zu beobachten war.

Diese ausgeprägte pH-Veränderung könnten eine mögliche Erklärung für die Veränderungen der Expression der Adhäsionsmoleküle sein. Um den direkten Einfluß von pH-Wert Änderungen zu untersuchen wurden unsere Zellen veränderten pH-Werten des Mediums ausgesetzt. Nach Inkubation im entsprechenden Medium wurde

nach dem festgesetzten Zeitschema die Expression der verschiedenen Adhäsionsmolekülen bestimmt. Interessanterweise fanden wir keine Veränderungen der Expressionintensitäten. Alle vier genannten Adhäsionsmoleküle zeigten keine signifikanten Veränderungen des Expressionsverhalten nach Inkubation der Tumorzellen HT-29 in saurem bzw. basischen Medium.

Somit scheint nach unseren Ergebnissen die pH-Veränderung auf die Expressionsstärken der Adhäsionsmoleküle eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

### **5.3 Einfluß des Pneumoperitoneums auf den intrazellulären Kalziumgehalt von Kolonkarzinomzellen (HT-29)**

Unserer Versuchsreihe zeigt, dass es nach bzw. während der Inkubation mit Kohlendioxid zu einem signifikanten Anstieg des Kalzium in der HT-29 Tumorzelle kommt. 30 Minuten nach Inkubation normalisiert sich der intrazelluläre Kalziumgehalt der Tumorzellen rasch. Dabei wird deutlich, dass unterschiedliche Drücke keinen Unterschied in den Konzentrationsveränderungen des intrazellulären Kalziums verursachen.

Helium dagegen hat keinen Einfluss auf den intrazellulären Kalziumgehalt. Auch wenn die Ergebnisse eher einen Abfall des intrazellulären Kalziumgehaltes vermuten lassen, sind diese Veränderungen nicht signifikant.

Die durch die Inkubation mit Kohlendioxid und unterschiedlichen Drücken ausgelösten intrazellulären Kalziumschwankungen könnten vielfältige intrazelluläre Reaktionen auslösen, da Kalzium zahlreiche biochemische und zellphysiologische Funktionen besitzt (90). Kalzium ist nicht nur bei der Knochenmineralisierung beteiligt, es spielt auch bei der Blutgerinnung und der Zellmembranstabilisierung eine wesentliche Rolle (91).

Als sogenannter „second messenger“ hat Kalzium eine regulatorische Schlüsselfunktion bei der Signaltransduktion innerhalb von Zellen (91,92). Als weiteres kann Kalzium eine Zelle zur Ausübung ihrer spezifischen Funktion stimulieren, wie beispielsweise die Kontraktion oder auch Biosynthese und Sekretion von spezifischen Stoffen (150,151). Dies wiederum bedeutet, dass eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Aktivität von Zielproteinen beeinflussen könnte (152). Die Aufrechterhaltung einer normalen intrazellulären Kalziumkonzentration scheint somit für die Zelle von vitalem Interesse zu sein. Massive Veränderungen der intrazellulären Konzentration könnten zu einer Veränderung der normalen Stoffwechselsituation der Zelle führen.

Inkubation in Kohlendioxid führt zu einer solchen massiven Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Veränderungen werden durch Schwankungen des extrazellulären und intrazellulären pH-Wertes hervorgerufen (108). Schwankungen im pH-Bereich können spezifische Transportproteine und Enzyme

soweit in ihrer Aktivität modifizieren, dass somit Veränderungen des intrazellulären Kalziums erfolgen.

Der durch die Azidose bedingte, direkte intrazelluläre Kalziueinstrom nach bzw. während der Inkubation mit Kohlendioxid erfordert jedoch eine kritische Interpretation. Normalerweise wird ein Zell-Messenger wie Kalzium durch eine komplizierte Interaktion von Liganden mit Zellrezeptoren vermittelt (153). Erhöhtes freies intrazelluläres Kalzium kann Kalziumkanäle öffnen, welche an der äußeren Zellwand lokalisiert sind und die Sensitivität von IP<sub>3</sub> Rezeptoren für IP<sub>3</sub> durch einen positiven Feedback erhöhen (154). Die erhöhte zelluläre Konzentration von Wasserstoffionen, bedingt durch Kohlendioxid, scheint einen Einfluss auf den Kalziueinstrom zu haben (155). Es wird vermutet, dass die spannungsabhängigen Kalziumkanäle durch Veränderungen des Membranpotentials beeinflusst werden. Andererseits könnte der erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel ein Ergebnis von aktivierten Ionenaustauscher sein, um die H<sup>+</sup>-Ionen Konzentration in der Zelle aktiv zu senken. Die intrazelluläre zytoplasmatische Kalziumkonzentration wird normalerweise eng begrenzt und auf Werte um 100 nmol/L gehalten. Demgegenüber stehen vergleichsweise hohe Konzentrationen sowohl extrazellulär (1,8 mmol/L), als auch in intrazellulären Kompartimenten wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (1,4 mmol/L) gegenüber. Die jeweiligen Gradienten werden über eine Reihe verschiedener Transportproteine, Enzyme und energieverbrauchende Pumpmechanismen aufrechterhalten (152).

Während der Kohlendioxidinkubation werden diese Regelmechanismen verlassen und es kommt zu einem ungehemmten Kalziueinstrom in die Tumorzelle. Dieser intrazelluläre Kalziueinstrom führt auch in der Tumorzelle zu massiven Veränderungen des biophysiologicalen Haushaltes und zu einer Aktivierung multipler intrazellulärer Systeme. Der erhöhte intrazelluläre Kalziumgehalt führt zu einer verstärkten Gentranscription (156), zu einer Aktivierung des Zellzykluses (156) und möglicherweise auch zu einer Modifikation der Expression von Adhäsionsmolekülen.

Insgesamt zeigt unsere Versuch, dass Kohlendioxid einen ganz entscheidenden Einfluß auf den intrazellulären Kalziumspiegel hat. Helium dagegen beeinflusst in unserer Versuchsreihe die Kalziumkonzentration nicht. Dies kann zu grundlegenden

Veränderungen der Zellphysiologie führen und möglicherweise beeinflusst dieser intrazelluläre Kalziumeinfluß auch die Intensität von Adhäsionsmolekülen, zumal einige Adhäsionsmoleküle Kalzium abhängig sind (124).

Lassen sich nun die gewonnenen Daten aller drei Versuchsreihen auf die Ergebnisse der zahlreichen, in der Diskussion erwähnten Tierversuche und vor allem auf die klinische Realität übertragen? Und wenn ja, so stellt sich die Frage, ob die gewonnenen Resultate Schlussfolgerungen auf den Einsatz der Laparoskopie in der onkologischen Chirurgie erlauben?

Betrachten wir zunächst die zahlreichen Tierversuche, die zeigen konnten, dass das Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid einen stimulierenden Einfluß auf das intraperitoneale Tumorwachstum hat und vergleichen wir diese Daten mit denen in unserer Arbeit gefundenen Ergebnissen. Es muss deutlich gemacht werden, dass diese Tiermodelle, die klinische Situation nur unzureichend abbilden und eher das seltene Bild einer äußerst aggressiven Peritonealkarzinose simulieren, in dem Tumorzellen in hoher Konzentration in die Abdominalhöhle gegeben werden. Da die klinische Realität meist anders aussieht, müssen diese Daten mit Vorsicht interpretiert werden. Auch wenn unterstellt wird, dass Tiere unter diesen modellhaften Bedingungen genauso reagieren wie Menschen, so fallen doch einige gravierende Unterschiede ins Gewicht, die es ratsam erscheinen lassen, aus den Tierexperimenten keine unmittelbaren klinischen Konsequenzen abzuleiten.

Trotzdem, und das ist wichtig, deuten die tierexperimentellen Studien darauf hin, dass das Pneumoperitoneum Konditionen schafft, die für das Tumorwachstum eher von Vorteil sind.

In Bezug auf die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung unserer Studie scheinen die Beobachtungen und Ergebnisse der oben erwähnten Tierversuche nicht überein zustimmen. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das Pneumoperitoneum sowohl mit Kohlendioxid als auch mit Helium zu keinen strukturellen Veränderungen des Peritoneums führt.

Die elektronenmikroskopische Struktur des Peritoneums der Ratten und somit die Integrität bleibt nach Aufbau des Pneumoperitoneums erhalten. Somit bestätigt sich nicht der Verdacht einer verbesserten und verstärkten Adhärenz von Tumorzellen aufgrund zerstörter bzw. veränderter Peritonealstrukturen. Diese im Vergleich zu anderen Studien überraschenden Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass das Pneumoperitoneum eher keinen Einfluss auf das Peritoneum hat.

Ob diese Resultate auch eine klinische Bedeutung haben, ist fraglich, da auch hier wieder grundsätzlich andere Bedingungen vorliegen (längere Operationszeiten, solide Tumoren, höherer Gasverbrauch).

Unabhängig davon und als Konsequenz der Diskussion, sollte der intraperitoneale Druck und auch der Gasverbrauch so gering wie möglich gehalten werden, um eine mögliche mechanische Belastung des Peritoneums so gering wie möglich zu halten und somit die strukturelle Integrität des Peritoneums zu gewährleisten.

Anders als bei den rasterelektronischen Untersuchungen zeigen die molekularbiologischen Untersuchungen einen klaren Effekt des Kohlendioxids auf die Expression von Adhäsionsmolekülen. Dabei jedoch einen Bezug auf die tierexperimentellen Ergebnisse bzw. eine klinische Relevanz zu finden ist auch hier schwierig und es bedarf weiterer molekularbiologischer Untersuchungen, um eine eindeutige Interpretationen zu zulassen.

Andererseits ist es grundsätzlich möglich einen Zusammenhang zwischen der kurzfristigen verminderten Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf den Kolonkarzinomzellen und den verstärktem Tumorwachstum im Tiermodell zu finden. Besonders die verminderte Konzentration der E-Cadherin Expression, aber auch die veränderte Expression von CD44v6, ICAM-1 und  $\beta$ 1-Integrin könnten ein verstärktes Tumorwachstum im Tiermodell erklären. Aber auch diese Beobachtungen bedürfen weiterer in-vitro und vor allem in-vivo Untersuchungen. Die interessanteste Erkenntnis speziell der molekularbiologischen Experimente ist die, dass auch in diesem Fall Kohlendioxid einen deutlich stärkeren Einfluß auf die Expression von Adhäsionsmolekülen hat als Helium und diese Beobachtung deckt sich wiederum mit den Ergebnissen der Tierversuche.

Um Konsequenzen für den klinischen Alltag aus diesen Ergebnissen abzuleiten bzw. Schlussfolgerungen zu ziehen, sollte man auch in diesem Falle vorsichtig sein. Die laparoskopische Realität sieht anders aus als die in-vitro Realität. Andere Formen der Versuchsdurchführung mit immunhistologischen Untersuchungen könnten weitere wichtige Daten erbringen. Besonders solide Tumorformen scheinen anders auf Gas und Druck zu reagieren, als freie disseminierte Tumorzellen in der Bauchhöhle.

Relativ eindeutig sind die Ergebnisse der intrazellulären Kalziummessungen, die zu einem deutlichen Anstieg des Kalziums während des Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid führt. Die kurzfristigen massiven Veränderungen sind sicherlich bedeutsam und zeigen den pathophysiologischen Einfluss des Gases auf die Tumorzelle. Ob allerdings die langfristigen Auswirkungen dieser kurzfristigen Konzentrationsveränderungen einen Einfluß auf die Malignitätskapazität einer Tumorzellen hat, bleibt auch hier offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Insgesamt schlussfolgern wir, dass das Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid zwar den strukturellen Aufbau des Peritoneums nicht verändert, molekularbiologisch und physiologisch jedoch in die Funktion der Tumorzelle eingreift. Pathophysiologisch deuten die molekularbiologischen Ergebnisse drauf hin, dass eine Tumorzellen durch das Pneumoperitoneum mit Kohlendioxid eine Veränderung bzw. Modifizierung ihrer Malignität erfährt könnte. Ob dies allerdings auf die klinische Realität einen Einfluß hat, läßt sich zur Zeit noch nicht eindeutig evaluieren.

In zukünftigen Studien müssen diese Untersuchungen auch in klinisch relevanten Bedingungen durchgeführt werden. Dabei spielen Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen von Tumorgewebe, aber auch von Peritoneal- und Immunzellen eine wichtige Größe.