

Aus dem
Zentrum der Chirurgie des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. Bechstein

DIE PROLIFERATION HUMANER KARZINOMZELLEN
UNTER DEM EINFLUSS EINES
IN-VITRO-PNEUMOPERITONEUMS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Thorsten Bruttel aus Neustadt an der Weinstraße

Frankfurt am Main, 2006

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. C. N. Gutt
Koreferent:	Prof. Dr. J. Stein
Tag der mündlichen Prüfung:	3.3.2008

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1	Historischer Rückblick	Seite 2
1.2	Derzeitiger Stand der Forschung	Seite 3
1.3	Ziele der Arbeit	Seite 7

2. MATERIAL UND METHODE

2.1	Zellen	Seite 9
2.2	Konzeption und Durchführung	Seite 10
2.2.1	Zellkultivierung	Seite 10
2.2.2	CO ₂ -Exposition als gemeinsame Ausgangsbedingung	Seite 11
2.2.3	Vorversuche	Seite 14
2.2.3.1	Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer	Seite 16
2.2.3.2	pH-Wert-Bestimmungen	Seite 18
2.2.4	Hauptversuche	Seite 19
2.2.4.1	Nekrosefärbung mit Propidiumiodid	Seite 19
2.2.4.2	Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green	Seite 22
2.2.5	Zusatzversuche	Seite 26
2.2.5.1	Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz	Seite 26
2.2.5.2	Plateaubestimmung	Seite 28
2.2.6	Statistische Verfahren und Programme	Seite 30

3. ERGEBNISSE

3.1	Vorversuche	Seite 31
3.1.1	Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer	Seite 31
3.1.2	pH-Wert-Bestimmungen	Seite 35
3.2	Hauptversuche	Seite 36
3.2.1	Nekrosefärbung mit Propidium-Iodid	Seite 36
3.2.2	Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green	Seite 38
3.3	Zusatzversuche	Seite 45
3.3.1	Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz	Seite 45
3.3.2	Plateaubestimmung	Seite 46
3.4	Zusammenfassung	Seite 48

4. DISKUSSION	Seite 50
---------------	----------

5. LITERATUR	Seite 58
--------------	----------

6. ANHANG	Seite 69
-----------	----------

DANKSAGUNG	Seite 77
------------	----------

ERKLÄRUNG	Seite 78
-----------	----------

LEBENSLAUF	Seite 79
------------	----------

1 EINLEITUNG

INHALT DES ERSTEN KAPITELS

1.1 Historischer Rückblick.....	Seite 2
1.2 Derzeitiger Stand der Forschung	Seite 3
1.3 Ziele der Arbeit.....	Seite 7

1.1 Historischer Rückblick

Die Technik der minimalinvasiven Chirurgie hat sich bis heute in vielen operativen Disziplinen etabliert. So werden in der Gynäkologie, der Viszeral- ebenso wie in der Thoraxchirurgie schon seit längerer Zeit endoskopische Operationen durchgeführt.

Die Grundlagen der endoskopischen Technik wurden bereits vor mehr als einem Jahrhundert gelegt. Im Jahre 1805 inspizierte der in Frankfurt geborene Arzt Philipp Bozzini erstmals Urethra und Harnblase (1). Durch eine Vorrichtung, bestehend aus einer Kerze als Lichtquelle, einem Spiegelsystem und einem Tubus, der in die Harnröhre eingeführt wurde, konnten Harnblasensteine und Tumoren unter direkter Sicht diagnostiziert werden. Von den Zeitgenossen Bozzinis wurde seine Erfindung allerdings als Spielerei abgetan (2, 3). Die weiteren Entwicklungen bedienten sich jedoch ebenfalls Bozzinis Prinzip. So entwickelten in den Jahren um 1850 der Amerikaner Fisher und der Franzose Segales unabhängig voneinander Optiken zur Inspektion der Vagina. Eine Weiterentwicklung dieser Systeme stellte eine Erfindung des Franzosen Desormeaux dar. Dieser setzte eine Sammellinse in eine Röhre ein und konnte somit den Strahl der Lichtquelle bündeln, was zu einer Verstärkung der Lichtintensität führte. Ein Brennstoff aus Alkohol und Terpentin sollte zudem für eine nochmals bessere Beleuchtung sorgen. Komplikationen wie schwere innere Verbrennungen, die den Patienten mit diesen Sammellinsen zugefügt wurden, verhinderten die weitere Verbreitung der Methode (1).

Den nächsten Schritt hin zur Entwicklung moderner Endoskope tat 1877 Nitze. Er bediente sich nicht nur einer mittels elektrischen Stromes zum Glühen gebrachten Platinspirale, sondern er sorgte auch durch die permanente Spülung mit Eiswasser für eine ausreichende Kühlung des optischen Systems. Damit konnte er die zuvor so häufig aufgetretenen Verbrennungen vermeiden. Auch diese Konstruktion wurde zunächst für die Zystoskopie eingesetzt (4).

1889 erweiterte der Franzose Biosseau de Rocher den ursprünglich einfachen optischen Kanal zu einem doppelläufigen System mit getrenntem Arbeits- und Sichtkanal. Damit war neben der Inspektion einer Körperhöhle auch die Manipulation darin möglich. So

waren jetzt auch endoskopische Eingriffe an Oesophagus, Trachea, Kehlkopf und Enddarm durchführbar (5, 6, 7).

Die erste laparoskopische Untersuchung der Bauchhöhle nahm 1901 Georg Kelling vor. In seinen ersten Versuchen, die zunächst noch an Hunden stattfanden, benutzte er zur Insufflation Luft, die er zuvor mit Hilfe steriler Watte filterte. Am Menschen wurde die Methode nur eingesetzt, um durch Erhöhung des intraperitonealen Druckes intraabdominelle Blutungen zum Stillstand zu bringen (8, 9) Weiterentwickelt wurde Kellings Methode durch Hans Christian Jacobaeus (2, 3). In der Münchener Medizinischen Wochenschrift veröffentlichte er 1912 seine Erfahrungen, die er an einem Kollektiv von 69 Patienten in insgesamt 109 laparoskopischen Eingriffen gesammelt hatte (10). Immer noch stand jedoch der diagnostische Zweck im Vordergrund.

In der Mitte der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts kam es zu Verbesserungen der mechanischen und optischen Geräte. Waren die früheren Optiken auf im Inneren der zu untersuchenden Körperhöhle platzierte Lichtquellen angewiesen, so war es nun mit der Glasfasertechnik möglich, mittels externer Lichtquellen den Situs zu beleuchten. Dies bedeutete nicht nur eine deutliche Platzersparnis im Operationsgebiet. Auch die Hitzeschäden durch die ehemals internen Lichtquellen traten nun nicht mehr auf. Ab 1957 kamen erstmals auch flexible Endoskope zum Einsatz (2, 3, 5).

Der womöglich bedeutendste Beitrag für die Entwicklung der laparoskopischen Operationstechnik stammt von dem Kieler Gynäkologen Kurt Semm. Die wichtigsten Instrumente und Techniken, die auch heute noch Verwendung finden, wurden von ihm in den siebziger Jahren entwickelt. Auch die erste laparoskopische Appendektomie wurde 1983 durch Semm durchgeführt (2, 4).

Seit der Mitte der achtziger Jahre hat sich die endoskopische Technik in der Chirurgie immer mehr etablieren können. Im Jahr 1992 wurden in den USA mehr als die Hälfte aller Cholezystektomien laparoskopisch durchgeführt. In Deutschland lag der Anteil laparoskopischer Cholezystektomien 1991 bei 24,9% (11). In mehreren Studien wurden direkte Vergleiche zwischen der konventionellen und der laparoskopischen Technik der Cholezystektomie angestellt (12, 13). In den Ergebnissen erwies sich die minimalinvasive Variante als der konventionellen teilweise überlegen. Vor allem die kürzeren Liegezeiten und die geringere postoperative Beeinträchtigung der Patienten spielen hier eine Rolle.

1.2 Derzeitiger Stand der Forschung

Die vormals ausschließlich diagnostisch genutzte Technik der Laparoskopie hat sich im Laufe der Jahre auch als Methode der operativen Therapie durchgesetzt. Wurden zunächst nur kleinere Eingriffe wie Appendektomien oder Cholecystektomien laparoskopisch durchgeführt, kommt die minimalinvasive Technik nun auch zunehmend bei Operationen wie beispielsweise Darmresektionen zum Einsatz (14, 15, 16, 17, 18, 19). Mögliche Vorteile können sein:

- geringeres operatives Trauma
- schnellere Wundheilung
- kürzere Verweildauer
- geringere Rate postoperativer Adhäsionen im Vergleich zur Laparotomie
- geringere Beeinträchtigung der Immunfunktion

Den hier womöglich größten Vorteil der minimalinvasiven Methode gegenüber der konventionellen Laparotomie könnte die Verminderung des durch die Operation bedingten Traumas und Stresses für die Patienten darstellen. Vermindertes Trauma bedeutet zum einen weniger postoperative Schmerzen, was die postoperative Mobilisation erleichtert. Damit können gerade bei älteren Patienten zum einen das operative Risiko selbst und zum anderen die Rate postoperativer Komplikationen (14, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 15) reduziert werden. Diese Faktoren können kürzere Liegezeiten und damit dank einer geringeren Anzahl an Krankheitstagen (25, 26, 28) eine deutliche Kostenersparnis bedeuten. Dies gilt nicht nur für die Viszeralchirurgie, sondern auch für alle anderen Disziplinen, welche die Technik des laparoskopischen Operierens anwenden (24, 29). Darüber hinaus beschreiben einige Autoren für am Tiermodell durchgeführte Laparoskopien eine geringere Inzidenz postoperativer Adhäsionen als nach konventioneller Laparotomie (22).

Eine lange bekannte Nebenwirkung eines jeden operativen Eingriffs ist dessen negativer Einfluß auf die systemischen Immunktionen des Patienten in der postoperativen Phase. Das Ausmaß der systemischen Immunsuppression hängt dabei auch von dem Ausmaß des operativen Stresses ab. Auch hierfür haben einige Autoren gezeigt, daß für einen gegebenen Eingriff die Schwere dieser Kompromittierung im Falle der laparoskopischen Variante geringer sein kann als bei der Laparotomie. Dies haben verschiedene Untersuchungen nicht nur für das Tiermodell (30, 31, 32), sondern auch klinisch (33, 34, 35, 36, 37, 38) bestätigen können. Auch die mit den kleineren Inzisionen verminderten Eintrittsmöglichkeiten für Bakterien dürften für die vergleichsweise geringere Infektionsrate eine nicht unwesentliche Rolle spielen (35). Allerdings konnten diese immunologischen Vorteile nicht in allen Studien nachgewiesen werden. So fanden Vallina und Velasco (39) in der ersten postoperativen Woche auch im Falle laparoskopisch durchgeführter Operationen einen deutlichen Rückgang der T-Helferzellen im peripheren Blut, der sich von den für die Laparotomiegruppe gefundenen Werten nicht signifikant unterschied. Hewitt et al. (40) bestimmten als immunologische Parameter IL-6, das T4/T8-Verhältnis und die HLA-DR-Expression bei Patienten mit colorektalem Karzinom, die entweder eine laparoskopische oder eine konventionelle Colonresektion erhalten hatten. Angesichts ihrer Ergebnisse kommen die Autoren zu dem Schluß, daß die laparoskopische Methode keinen immunologischen Vorteil gegenüber der konventionellen Technik bietet. Smit et al. (41) äußern jedoch angesichts der andernorts gefundenen Hinweise auf die immunologischen Vorteile der Laparoskopie (s. o.) die Ansicht, daß wegen dieser günstigen Umstände die minimalinvasive Technik gerade für die Tumorchirurgie geeignet sei, da durch eine minimalinvasive Vorgehensweise die Eliminationsfähigkeit des körpereigenen Immunsystems gegenüber metastatischen Zellen am wenigsten beeinträchtigt werde.

Entsprechend halten Milsom et al. (42) den Einsatz der laparoskopischen Technik auch für die kurative Resektion maligner Tumore für denkbar. Gute Ergebnisse nach laparoskopischer Resektion von Kolonkarzinomen beschrieben bereits im Jahre 1994 Rouffet et al. (43).

Jedoch ist - gerade bei onkologischen Eingriffen - die Wirkung eines Pneumoperitoneums mit Kohlendioxid speziell auf den Tumor und auf das lokale peritoneale Milieu noch nicht hinreichend geklärt. So besteht noch Unklarheit bezüglich

- der mechanischen Effekte der Laparoskopie,
- der Auswirkungen des erhöhten intraabdominellen Drucks,
- des Einflusses des CO₂-Pneumoperitoneums auf das intraperitoneale Milieu und
- der Auswirkung des Pneumoperitoneums auf das Wachstum intraperitonealer Tumore und intraperitonealer Metastasen.

Mechanische Effekte. Bei der Anlage eines Pneumoperitoneums wird über eine Hautinzision die Verres-Nadel in die freie Bauchhöhle eingeführt, durch Insufflation von Kohlendioxid die Bauchdecke angehoben und anschließend über eine weitere Inzision ein Trokar für die Optik eingebracht. Nach Inspektion des Bauchraumes werden über zusätzliche Inzisionen weitere Trokare als Arbeitskanäle eingeführt. Mit Hilfe des CO₂-Insufflators wird der intraperitoneale Druck während der Operation bei etwa 12-14 mmHg konstant gehalten. Die Entfernung eventueller Resektate erfolgt über einen der Arbeitskanäle, entweder durch den Trokar selbst oder – nach Entfernen des Trokars – über die entsprechende Inzision in der Bauchwand.

In der Vergangenheit waren mit dieser Technik auch verschiedene Patienten mit intraperitoneal gelegenen malignen Tumoren operiert worden, wonach es zu einer Metastasierung des Tumors in den Arbeitskanal kam. In einem Teil der Fälle war ein Tumor zuvor nicht bekannt (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51). In den übrigen Fällen handelte es sich um elektive tumorchirurgische Eingriffe (52). Als mögliche Ursachen für die Entstehung dieser Trokarkanal-Metastasen werden eine zu starke Manipulation und Verletzung des Tumors (49, 53, 54, 55) und eine Verschleppung von Tumorzellen in die Arbeits- und Trokarkanäle (53, 55, 56, 57) verantwortlich gemacht. Für letztere Annahme finden sich auch tierexperimentelle Hinweise (58, 59, 60, 61, 62).

Die Qualität der chirurgischen Technik und die persönliche Erfahrung des Operateurs werden als weitere Faktoren angesehen (55, 63, 64).

Intraabdomineller Druck. Neben den rein mechanischen Manipulationen beim Einführen und Entfernen der Trokare und beim Manipulieren am Tumor selbst sehen andere Autoren auch im Insufflieren des für das Pneumoperitoneum verwandten Gases einen für die Entstehung intraperitonealer Metastasen entscheidenden Vorgang (65, 66). Hierbei spielt sowohl die Art des eingesetzten Gases als auch die Höhe des Druckes, mit dem dieses insuffliert wird, eine Rolle (67). Moreira (68) und Wittich (69) gingen in tierexperimentellen Arbeiten davon aus, daß beim Einströmen von Kohlendioxid in die Bauchhöhle Aerosole entstehen, welche Tumorzellen enthalten können. Die Konzentration an Tumorzellen in einem solchen Aerosol war dabei von der Höhe des Insufflationsdrucks unabhängig (68). Als Konsequenz wird daher andernorts die Verwendung niedriger Drücke zur Anlage des Pneumoperitoneums oder der Einsatz der gaslosen Laparoskopie (70, 71, 72) empfohlen. Jedoch kommen Wittich und Marquet in einer weiteren Untersuchung zu dem Ergebnis, daß dem Phänomen der Aerosobildung in der Praxis keine Bedeutung bei der intraperitonealen Metastasenbildung zukommt (73).

Andere Autoren sind der Ansicht, daß auch die Art des Gases für die intraperitoneale Metastasierung von Bedeutung ist. So konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, daß es bei der Verwendung von Kohlendioxid zu einer stärkeren Tumoraussaat kommt als beim Einsatz von Helium oder der gaslosen Technik (74, 75, 76).

Bislang ist jedoch noch nicht eindeutig erwiesen, daß die laparoskopische Resektion maligner Tumore - verglichen mit der konventionellen Technik - notwendigerweise mit einem erhöhten Risiko einer intraperitonealen Metastasierung verbunden ist. In der Literatur finden sich hierzu widersprüchliche Aussagen.

So konnte in zahlreichen tierexperimentellen Vergleichen zwischen konventioneller Laparotomie und Laparoskopie hinsichtlich des Ausmaßes der operationsbedingten Metastasierung (77, 78, 79 80, 81, 82, 83, 84, 85) kein Unterschied festgestellt werden. Zum Teil erwies sich die laparoskopische Methode der konventionellen sogar als überlegen (86, 87). Ramos et al. (88) fanden nach Durchsicht von 208 Patientenakten nach laparoskopisch durchgeführten Darmresektionen nur in solchen Fällen ein erhöhtes Risiko einer perioperativen Metastasierung, in denen auch der Primärtumor bereits weit fortgeschritten war. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Buchmann (89) und Cook (90).

Einfluß des CO₂-Pneumoperitoneums auf das peritoneale Milieu. Jedes Trauma hat als Reaktion des Immunsystems eine Beeinträchtigung der systemischen Immunfunktion zur Folge. Das Ausmaß dieser Beeinträchtigung ist von der Stärke der Traumatisierung abhängig. Das Ausmaß einer postoperativen systemischen Immunsuppression hängt daher auch entscheidend von der Stärke des operativen Traumas ab. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß nach laparoskopischen Eingriffen die postoperative systemische Immunkompromittierung deutlich geringer ausgeprägt ist als nach einer Laparotomie (31, 34, 91). Zudem kann Kohlendioxid auch einen lokalen toxischen Effekt auf intraperitoneal gelegene Tumorzellen haben (92, 93).

Das Peritoneum selbst spielt demgegenüber eine bedeutende Rolle bei der lokalen Reaktion des Immunsystems auf einen abdominalchirurgischen Eingriff (97, 98), jedoch auch bei der Elimination maligner Zellen. Hierbei kommt den peritonealen Makrophagen eine zentrale Bedeutung zu (99). Sie stellen mit über 90% den größten Anteil der peritonealen Lymphozyten dar (100). Während jedoch die systemische Immunfunktion von der minimalinvasiven Chirurgie profitiert, scheint die Funktion der peritonealen Makrophagen durch ein CO₂-Pneumoperitoneum beeinträchtigt zu werden (101). So zeigen verschiedene Studien (102, 103, 104, 105, 106, 107), daß peritoneale Makrophagen durch ihre Exposition gegenüber Kohlendioxid in hohen Konzentrationen, wie dies während eines CO₂-Pneumoperitoneums der Fall ist, in ihrer Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen und zur Phagozytose und damit in ihrer antitumoralen Funktion beeinträchtigt werden (100). Deren verminderte Fähigkeit zur Sekretion von TNF- α scheint in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu besitzen (99, 108, 109). Bei einem Ersatz von Kohlendioxid durch Helium scheint dagegen die zellvermittelte peritoneale Immunität besser erhalten zu bleiben (110). Außerdem nimmt unter Insufflation von Kohlendioxid nicht nur die Azidität des Peritoneums selbst, sondern auch die des Milieus eines intraperitonealen Tumors zu. Somit scheint dem Typ des Insufflationsgases (Luft, Helium, Kohlendioxid oder gaslos) eine Bedeutung hinsichtlich des Ausmaßes der peritonealen Immunkompromittierung zuzukommen. Dies könnte auch helfen zu erklären, weshalb nach einem CO₂-Pneumoperitoneum ein stärkeres Tumorwachstum gefunden werden kann als nach Laparotomie (94), gasloser Laparoskopie (95) oder bei der Verwendung von Helium als Insufflationsgas (96).

Weitere für die Integrität und Funktion des Peritoneums potentiell nachteilige lokale Einflüsse des Pneumoperitoneums können sein (38, 111):

- Dehnung der Bauchwand
- intraoperativ erniedrigte Temperatur im Bauchraum
- Exsikkose des Peritoneums

Wenn auch die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse noch nicht hinreichend geklärt ist, müssen die Auswirkungen eines CO₂-Pneumoperitoneums besonders auf die lokale peritoneale Immunfunktion vor allem bei der Entscheidung für oder gegen den Einsatz der laparoskopischen Technik für die Resektion maligner Tumore bedacht werden.

1.3 Ziele der Arbeit

Bei Durchsicht der zu dem Themenkreis Pneumoperitoneum und intraperitoneales Tumorstadium veröffentlichten Literatur kann festgestellt werden, daß Arbeiten mit reinen In-vitro-Versuchen (57) weniger häufig zu finden sind als Kombinationen solcher mit in-vivo durchgeführten Experimenten oder auch rein tierexperimentelle Arbeiten. Bei letzteren werden zunächst unterschiedliche Karzinomzellen in die Versuchstiere (meist Ratten, Mäuse, Hasen oder Hamster) eingebracht (22, 27, 30, 58, 60, 62, 70, 71, 72, 75, 86, 87, 112, 113, 114, 115). In der Regel erfolgt dann eine Einteilung der Population in mehrere Gruppen, beispielsweise eine Laparoskopie-, eine Laparotomie- und eine Kontrollgruppe, welche dann z. B. nur narkotisiert, aber nicht operiert wird. Nach zuvor festgelegten Zeiträumen werden die Tiere getötet und auf Tumorstadium am Inokulationsort und eventuelle Fernmetastasen untersucht. Ziel ist auch hier herauszufinden, inwieweit einzelne Operationstechniken sowie Modifikationen einer gegebenen Technik (z. B. durch Ersatz des für die Laparoskopie verwendeten Kohlendioxids durch Helium oder durch gänzlich Weglassen des Gases wie bei der gaslosen Laparoskopietechnik) zu Veränderungen der Proliferationsstärke der inokulierten Tumorzellen führen können. Man kann annehmen, daß es bei solchen In-vivo-Experimenten zu komplexen lokalen (116, 117, 118) und systemischen (119, 120, 121) Reaktionen des Organismus des Versuchstiers kommt. Dies kann das Versuchsergebnis in mehrfacher Hinsicht beeinflussen und die Beurteilung der gefundenen Ergebnisse erschweren.

Die vorliegende Arbeit baut ausschließlich auf In-vitro-Versuche, um solche Interaktionen auszuschließen und eine möglichst eindeutige Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen Exposition der Tumorzellen gegenüber einem Pneumoperitoneum und deren Reaktion darauf herstellen zu können.

Zielsetzung ist hierbei, Informationen zu gewinnen über das proliferative Verhalten von humanen Karzinomzellen zweier verschiedener Stämme nach deren Exposition gegenüber einem in vitro simulierten Pneumoperitoneum mit Drücken von zwölf, sechs und null Millimeter Quecksilbersäule bei einer einmaligen Expositionsdauer von vier Stunden. Zusatzversuche sollen Aufschluß geben über die Wirkung der verschiedenen Formen des Pneumoperitoneums auf das Nährmedium, wodurch ebenfalls eine Beeinflussung des Zellverhaltens möglich sein kann, sowie über das Ausmaß eventueller zytotoxischer Wirkungen von Kohlendioxid unter verschiedenen Drücken auf die damit behandelten Tumorzellen.

Die Technik des In-vitro-Pneumoperitoneums, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung gekommen ist und im Folgenden beschrieben werden wird, wurde im Labor des Zentrums für Chirurgie am Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität selbst entwickelt und im Verlaufe zahlreicher testweiser Kultivierungen, Behandlungen mit Kohlendioxid und Probemessungen weiter optimiert.

2. MATERIAL UND METHODE

INHALT DES ZWEITEN KAPITELS		
2.1	Zellen.....	Seite 9
2.2	Konzeption und Durchführung.....	Seite 10
2.2.1	Zellkultivierung.....	Seite 10
2.2.2	CO ₂ -Exposition als gemeinsame Ausgangsbedingung.....	Seite 11
2.2.3	Vorversuche.....	Seite 14
2.2.3.1	Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer.....	Seite 16
2.2.3.2	pH-Wert-Bestimmungen.....	Seite 18
2.2.4	Hauptversuche.....	Seite 19
2.2.4.1	Nekrosefärbung mit Propidiumiodid.....	Seite 19
2.2.4.2	Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green.....	Seite 22
2.2.5	Zusatzversuche.....	Seite 26
2.2.5.1	Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz.....	Seite 26
2.2.5.2	Plateaubestimmung.....	Seite 28
2.2.6	Statistische Verfahren und Programme.....	Seite 30

2.1 Zellen

In allen Versuchen kommen zwei humane Karzinomzell-Linien zum Einsatz. Zum einen ist dies mit DAN-G eine Pankreaskarzinomzelllinie, zum anderen mit CX-2 ein Colon-Adenokarzinom. Die beiden Zelltypen sind sich sowohl hinsichtlich ihrer Proliferationskinetik als auch ihrer Kulturbedingungen sehr ähnlich. So benötigen die Zellen sowohl von CX-2 als auch von DAN-G dasselbe Nährmedium und können in vitro als Monolayer kultiviert werden. Die Zeit, welche die Zellen benötigen, bis sie im Falle einer Kultivierung in Flaschen oder Platten am Boden ihres Kulturgefäßes adhärent geworden sind, ist ebenfalls nahezu identisch und liegt bei etwa 24 Stunden bei einer Zellzahl von $5 \cdot 10^6$ Zellen in einer 10-Milliliter-Suspension und Kultivierung in 75-cm²-Flaschen (Falcon Primaria®). Was die Zellkinetik betrifft, so beträgt das Subkulturintervall für beide Typen drei bis fünf Tage, und die Populationsverdoppelungszeit liegt gleichermaßen bei etwa dreißig Stunden. Diese in den kulturtechnisch relevanten Punkten also sehr ähnlichen Eigenschaften der Zellen beider Linien erleichtern die Planung und Durchführung der Versuche in erheblichem Maße. Zudem erlauben die zellkinetischen Gemeinsamkeiten einen direkten Vergleich der für die beiden Linien gewonnenen Ergebnisse aus den Proliferationsversuchen.

2.2 Konzeption und Durchführung

2.2.1 Zellkultivierung

Die nicht für Experimente benötigten Zellen von CX-2 und DAN-G werden in 75-cm²-Kulturflaschen der Firma Falcon Primaria® gehalten. Das hierfür benötigte Medium besteht aus 90% RPMI 1640 der Firma Gibco BRL und 10% fötalem Kälberserum, ebenfalls von Gibco BRL. Pro 500 ml Medium werden außerdem 10 ml HEPES-Puffer (Gibco BRL) zugegeben. Optional ist der Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL) als Infektionsschutz. Zwar muß dies im Falle einer Kultivierung in Flaschen nicht erfolgen, da diese dank in ihren Deckeln integrierter Bakterienfilter keimdicht verschlossen werden können. Werden die Zellen dagegen in sechs- oder 96-Loch-Platten gehalten, besteht diese Möglichkeit nicht, so daß sich hier die prophylaktische Antibiotika-Zugabe empfiehlt. Steriles Arbeiten unter der Werkbank ist selbstverständlich in allen Fällen obligat. Die pro Kulturflasche benötigte Mediummenge beträgt 10 ml. Alle zwei Tage wird das verbrauchte Medium unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank aus den Kulturflaschen abgegossen und durch frische Nährlösung ersetzt. Im Rahmen des zweitägigen Mediumwechsels erfolgt auch stets die Begutachtung der Zellen in den Flaschen unter dem Mikroskop.

Anhand des mikroskopischen Aspektes der Zellen in den Kulturflaschen wird gegebenenfalls die Indikation zum „Splitten“, d. h. zum Aufteilen der Zellen in einer Flasche und dem anschließenden Neukultivieren in mehreren neuen Kulturflaschen, gestellt. Dieses Aufteilen wird durchschnittlich jeden fünften bis siebten Tag notwendig. Der Zeitpunkt ist jedoch immer auch abhängig von der Ausgangszellzahl in der Flasche. Für die Neukultivierung wird das Medium aus den Flaschen abgegossen und durch je 10 ml PBS-Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) ersetzt. Mit diesem werden die Zellen kurz gewaschen. Danach wird der Puffer gegen je 5 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) ausgetauscht, mit welchem die Zellen fünf Minuten lang im Kulturschrank inkubiert werden. Nach dieser Zeit sind die Zellen vom Boden ihrer Kulturflasche abgelöst. Gegebenenfalls kann der Ablösevorgang durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenwand unterstützt werden. Die Trypsin-EDTA-Zellsuspension wird dann mit weiteren 5 ml Nährmedium aufgefüllt, in 50-Milliliter-Röhrchen (Falcon) überführt und anschließend weitere fünf Minuten lang bei 1.400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand in den Röhrchen abgegossen und das Sediment mit 5 Milliliter frischem Medium resuspendiert. Diese Suspension kann nun auf eine variable Anzahl neuer Kulturflaschen verteilt werden, abhängig von der Zahl der für die weiteren Versuche benötigten Flaschen. Abschließend wird die Suspension in jeder neuen Kulturflasche mit der entsprechenden Menge Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Für längere Zeit nicht benötigte Zellen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Vorbereitungen hierzu sind zunächst die selben wie für das regelmäßige Aufteilen der Zellen. Nach dem Abgießen des Mediums aus der Kulturflasche beginnt man entsprechend mit dem Spülen der Zellen mit 10 ml PBS Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) und dem anschließenden Inkubieren der Zellen mit Trypsin-EDTA (PanSystems) über fünf Minuten im Brutschrank. Wie gewohnt, wird die hierdurch gewonnene Trypsin-Zell-Suspension dann mit 5 ml Medium verdünnt, in 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt und in diesen fünf Minuten lang bei 1.400 U/min zentrifugiert.

Bereits in dieser Phase ist darauf zu achten, daß die verwendeten Gefäße und Lösungen gekühlt sind. So empfiehlt es sich, vor allem das Medium direkt aus dem Kühlschrank zu nehmen und nicht aufzuwärmen. Die Röhrchen für die Zentrifugation sollten eine ausreichend lange Zeit vorher im Gefrierschrank ebenfalls gekühlt worden sein. Diese Maßnahmen sollen ein zu schlagartiges und damit für die Vitalität der Zellen nachteiliges Abkühlen verhindern. Für die Zentrifugation sollte daher auch eine auf 4° C eingestellte Kühlzentrifuge verwendet werden. Am Ende der Zentrifugation wird der Überstand abgegossen. Nun folgen die für das Einfrieren spezifischen Arbeitsschritte. So wird das Sediment mit 1,0 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva Feinbiochemika Heidelberg) als Einfriermedium resuspendiert und in ebenfalls gut vorgekühlte 1,8-Milliliter-Kryo-Röhrchen (Nunc Dänemark) überführt. In diesen werden die Zellen zunächst in einem -80°C-Kühlschrank zwischengelagert. Erst am dritten Tag erfolgt dann das definitive Einfrieren in dem nochmals kälteren flüssigen Stickstoff.

Der Auftauvorgang muß ebenfalls dem Prinzip der langsamen Temperaturanpassung folgen. So müssen wieder kühle Lösungen und Zentrifugenröhrchen verwendet werden. Die Temperatur in der Zentrifuge darf nun aber Raumtemperatur entsprechen.

Die gefrorene Zellsuspension in dem Kryo-Röhrchen wird zunächst so lange in der Hand angewärmt, bis sich das Eis von der Wand des Röhrchens zu lösen beginnt. Die noch halb gefrorene DMSO-haltige Suspension wird in das kalte 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt und durch gründliches Auf- und Abpipetieren mit weiteren 10 ml des kalten Nährmediums vermischt. Die Zentrifugation erfolgt mit den üblichen Einstellungen. Anschließend wird durch das Abgießen des Überstandes auch das Gefriermedium entfernt. Durch Resuspendieren des Sediments mit jetzt warmem Medium und Überführen der Suspension in die vorbereitete 75-cm²- Kulturflasche (Falcon Primaria®) ist der Auftauvorgang abgeschlossen, und die Zellen können wie gewohnt weiterbehandelt werden. Es ist jedoch daran zu denken, daß die Verdoppelungszeiten zu Beginn einer neu eingeleiteten Kulturphase noch länger sind, als dies sonst der Fall ist. Für die weitere Versuchsplanung kann dies von Bedeutung sein.

2.2.2 Kohlendioxidexposition als gemeinsame Ausgangsbedingung

Sämtliche Zellen, die im Rahmen der verschiedenen Vor- und Hauptversuche (ausgenommen die im Kapitel "Zusatzversuche" vorgestellten Experimente) untersucht werden, erfahren im Vorfeld die selbe standardisierte Behandlung. Diese besteht in einer sowohl hyper- als auch isobaren Exposition gegenüber Kohlendioxid im Falle der mit Kohlendioxid zu behandelnden Zellen. Zusätzlich werden stets auch Zellen als Kontrollgruppe angesetzt, welche während der Zeit der Behandlung mit CO₂ unter Raumluftbedingungen gehalten werden. Dieses Arrangement ist dem Aufbau eines Tierversuches mit zum einen Laparoskopie mit Kohlendioxid unter verschiedenen Drücken, zum anderen mit konventioneller offener Laparotomie nachempfunden. Hierdurch soll die spätere Eingliederung der hier gewonnenen in-vitro-Ergebnisse in einen größeren Kontext, zu dem auch entsprechende in-vivo-Experimente gehören, ermöglicht werden.

Zur Vorbereitung der Exposition wird vor Beginn der CO₂-Behandlung das Medium aller zu behandelnden Zellen ebenso wie das der Zellen der Kontrollgruppen unter sterilen Bedingungen durch frische Nährlösung ersetzt. Hierdurch werden hinsichtlich der Ernährungssituation gleiche Ausgangsbedingungen für alle Tumorzellen, der Test- ebenso wie der Kontrollgruppen, geschaffen. Zudem wird durch den Mediumwechsel auch für einen optimalen pH-Wert vor der CO₂-Exposition gesorgt. Dies ist um so wichtiger, als die Behandlung mit Kohlendioxid selbst einen Anstieg der Azidität des Nährmediums zur Fol-

ge hat. Dieser Anstieg wiederum ist abhängig von der Höhe des eingestellten Gasdruckes in dem Insufflationskasten während der Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid.

Nach dem Mediumwechsel werden die wieder verschlossenen Kulturgefäße in die Insufflationskästen eingesetzt. Die für die CO₂-Behandlung verwandten Insufflationskästen wurden nach eigenen Entwürfen in den Werkstätten des Universitätsklinikums Frankfurt am Main hergestellt. Sie haben eine Grundfläche von 30 cm*15 cm und eine Höhe von 5 cm. An den einander gegenüberliegenden schmalen Seiten der Kästen befinden sich etwa 0,5 cm oberhalb des Bodenniveaus ein Einlaß- und ein Auslaß-Ansatzstück mit Luer-Lock. An letzterem ist ein Schlauch angeschlossen, über den während der Exposition der Zellen gegenüber dem Kohlendioxid das ausströmende Gas in den Außenraum außerhalb des Inkubators abgeleitet wird. Dies verhindert die Kontamination der Umgebungsluft der außerhalb der Kästen, jedoch ebenfalls im Wärmeschrank befindlichen Kontrollgruppenzellen mit dem Gas.

Die Art und die Größe der Kulturgefäße variieren in Abhängigkeit vom Versuchsansatz und der geplanten Meßmethode. So kommen entweder Kulturflaschen mit 12,5 cm² oder 25 cm² Bodenfläche (Falcon) oder Falcon-Primaria®-Platten mit sechs oder 96 Löchern zum Einsatz. In jedem Fall werden die Zellen bereits vor der CO₂-Exposition in die endgültigen Gefäße überführt. Damit soll vermieden werden, daß die Zellen zusätzlich zu den gasbedingten Irritationen auch durch die Vorgänge des Spülens und Abtrypsinierens, wie dies ansonsten nach Ablauf der Expositionszeit notwendig wäre, weiter geschwächt werden. Dieses würde deren Proliferation möglicherweise dämpfen und damit die späteren Ergebnisse verfälschen.

In den Fällen, in denen Kulturflaschen zum Einsatz kommen, wird dafür Sorge getragen, daß deren Deckel mit Bakterienfiltern versehen sind, durch welche das Gas auch bei ansonsten geschlossener Flasche zu den Zellen gelangen kann. Gegenüber Flaschen mit filterlosem Deckel hat dies den Vorteil, daß das Aufschrauben der Flaschen, wodurch ansonsten der Gaseintritt ermöglicht werden müßte, vermieden werden kann. Dies mindert das Risiko einer Kontamination der Zellen mit Pilzen oder Bakterien während der Behandlung mit Kohlendioxid. Da jedoch im Falle der 96-Loch-Platten nicht mit Filtern gearbeitet werden kann, ist hier bereits vor der CO₂-Behandlung eine besonders sorgfältige Desinfektion der Insufflationskästen unumgänglich. Hierzu werden die Kästen - ebenfalls noch unter der Werkbank - mit siebzigprozentigem Isopropylalkohol gesprüht und fünfzehn Minuten lang fest verschlossen. Diese Zeitspanne entspricht der Einwirkzeit des Alkohols. Abschließend werden die Kästen mit einem sterilen Tuch ausgewischt, um eine Irritation der Zellen durch die Dämpfe der ansonsten noch im Kasten verbleibenden Alkoholreste während der Kohlendioxid-Einwirkung zu vermeiden. Das Einsetzen der Platten und das Verschließen der Kästen erfolgen dann ebenfalls unter der Werkbank.

Nach dem Einsetzen der Kulturgefäße werden die Insufflationskästen luftdicht verschlossen und anschließend in den vorbereiteten Inkubator gestellt. In diesem herrschen bezüglich Luftdruck und Luftzusammensetzung Umgebungsbedingungen. Die Lufttemperatur wird konstant auf 37° C gehalten. In bezug auf die Luftzusammensetzung unterscheiden sich die experimentellen Inkubatoreinstellungen von denen eines Inkubators zur Zellkultivierung. In letzterem beträgt der Anteil des Kohlendioxids fünf Prozent. Dies entspricht einem durchschnittlichen physiologischen Partialdruck von 5,065 kPa oder 38 mmHg (ausgehend von einem Atmosphärendruck von 760 mmHg, bzw. 101,3 kPa). Weiterhin entspricht dies damit dem mehr als Zehnfachen des Partialdrucks in der Atmosphäre und damit auch mehr als dem Zehnfachen des Partialdrucks im für die Versuche verwendeten Wärmeschrank. Hinsichtlich der Temperatur im Innern der Inkubatoren herrschen jedoch identische Bedingungen (37° C).

Die Zellen der Kontrollgruppe befinden sich für die Dauer der Exposition zwar im selben Inkubator wie die der Testgruppen, verbleiben jedoch außerhalb der Insufflations-

kästen, so daß sie nur der reinen Umgebungsluft ausgesetzt sind. Dies wird durch die oben beschriebene Ableitung des verbrauchten Kohlendioxids aus den Kästen in den Außenraum gewährleistet (*Abbildung 1*).

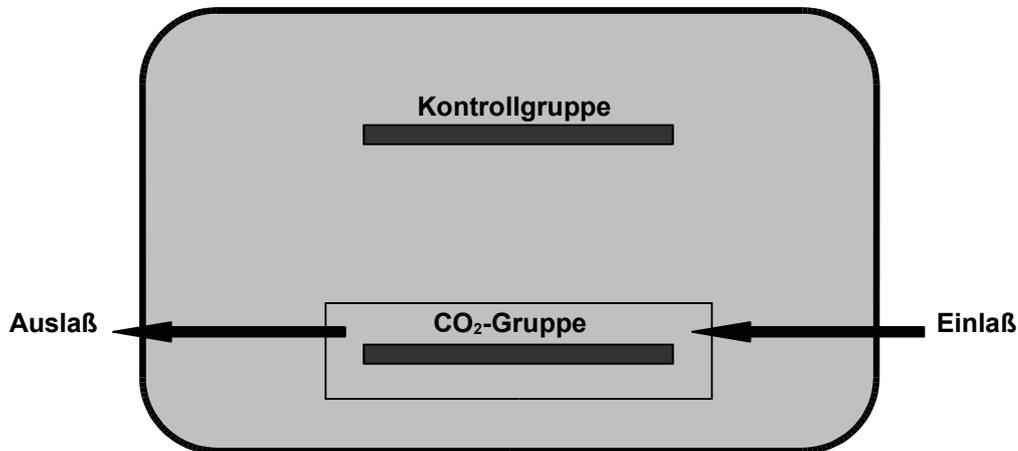


Abbildung 1: Anordnung der Kulturgefäße im Wärmeschrank zur CO₂-Behandlung

Es wird nun der Einlaßstutzen des Kastens mit dem Insufflator verbunden. Der Auslaß bleibt zunächst noch offen. Am Insufflator wird eine Flußrate von zehn Litern Kohlendioxid pro Minute eingestellt. Danach werden die Kästen mit insgesamt 15 Litern des Gases durchflutet. Hierdurch werden die im Inneren der Kästen verbliebene Umgebungsluft sowie die Dämpfe eventuell doch noch vorhandener Alkoholreste vollständig durch das Kohlendioxid verdrängt, und es wird eine CO₂-Konzentration von 100% erreicht. Nach diesem Schritt wird die Flußrate dann definitiv auf 1 l*min⁻¹ reduziert. Abschließend wird am Insufflator der gewünschte Druck von wahlweise null, sechs oder zwölf mmHg eingestellt. Im Falle der hyperbaren Einwirkung des Kohlendioxids mit sechs oder zwölf Millimeter Quecksilbersäule wird der Auslaß sodann verschlossen. Im Falle der isobaren CO₂-Exposition mit null Millimeter Quecksilbersäule unterbleibt das Verschließen des Auslasses, so daß die Zellen mit Kohlendioxid lediglich beströmt werden. Der Gasdruck im Innern der Kästen entspricht damit annähernd dem Atmosphärendruck. Die Flußrate beträgt auch hier einen Liter pro Minute und ist damit dieselbe wie bei den Überdruckversuchen. Die Druckschwankungen während der Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid betragen +/- 2 Millimeter Quecksilbersäule.

Der Ablauf der CO₂-Behandlung soll soweit möglich der Vorgehensweise im Rahmen einer längerdauernden laparoskopischen Operation nachempfunden werden. Der bei einem solchen Eingriff zu beobachtende unvermeidliche Gasverlust über Arbeitskanäle und Trokare soll durch das stündliche Ablassen des Kohlendioxids aus den Insufflationskästen simuliert werden. Während der hyperbaren CO₂-Exposition mit sechs oder zwölf Millimeter Quecksilbersäule wird deshalb nach jeder vollen Stunde der Auslaß geöffnet, und die Kästen werden nach demselben Schema wie vor Versuchsbeginn erneut mit Frischgas durchströmt. Im Anschluß hieran wird der Auslaß wieder verschlossen, und der gewünschte Druck wird erneut aufgebaut. Dieses Erneuern des Gases entfällt wiederum für die isobaren Versuche.

Bei der Laparoskopie am Menschen werden intraperitoneal hyperbare Drücke von zwölf bis vierzehn Millimeter Quecksilbersäule aufgebaut. Die im Rahmen der beschriebenen Experimente eingestellten Drücke liegen mit 12 +/- 2 mmHg annähernd im selben Be-

reich. Darüber hinaus erfahren die Zellen der Testgruppen zusätzlich jedoch auch die beschriebene Exposition gegenüber Drücken von sechs und null Millimeter Quecksilbersäule. Hierdurch sollen die in der Literatur unter anderen Bedingungen (108) beschriebenen Abhängigkeiten der Tumorzellproliferation vom Gasdruck wie hier geschildert in vitro untersucht werden.

Nach der vorgegebenen Expositionszeit von vier Stunden wird die Kohlendioxidzufuhr gestoppt. Die Kulturgefäße werden aus den Kästen genommen, und das Nährmedium wird erneut ausgetauscht. Dieser nochmalige Mediumwechsel muß erfolgen, weil die mehrstündige Einwirkung von Kohlendioxid einen starken Abfall des Medium-pH-Wertes um bis zu einen Punkt bedingt, was sich auf den Zellstoffwechsel nachteilig auswirkt. Auch dieses Mal wird das Medium in den Gefäßen der Kontrollgruppen-Zellen ebenfalls erneuert, um für die folgenden Versuche identische Ausgangsbedingungen zu schaffen. Nach dem Mediumwechsel werden die Zellen nach Maßgabe des jeweiligen Versuchsansatzes weiterverarbeitet.

2.2.3 Vorversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit vorzustellenden Experimente gliedern sich in die Teile "Vorversuche" und "Hauptversuche" sowie "Referenzarbeiten". Die Vor- und Hauptversuche unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zielsetzung sowie Färbe- und Meßtechnik. Gemeinsam ist ihnen die Methode der iso- und hyperbaren Zellbehandlung mit Kohlendioxid. Im Falle der beiden Referenzarbeiten werden die Zellen keinem Kohlendioxid ausgesetzt, sondern unter Raumluftbedingungen gehalten.

Es werden zwei Vorversuche durchgeführt, zum einen eine Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer analog der Vorgehensweise Jacobis (122), die im Anschluß an die Zellbehandlung mit iso- und hyperbarem Kohlendioxid vorgenommen wird; zum anderen eine pH-Wert-Bestimmung, die ebenfalls postexpositionell nach erfolgter CO₂-Behandlung stattfindet. Diese beiden Vorversuche dienen dazu zu überprüfen, inwieweit die von Jacobi gewonnenen Ergebnisse mit den hier zu untersuchenden Zellen reproduziert und korreliert werden können. Hierzu wird auf den von Jacobi geschilderten Aufbau für die in-vitro-Versuche (122) zurückgegriffen.

Dem Versuch zur pH-Wert-Bestimmung liegt die Überlegung zugrunde, daß es bei einer vierstündigen Einwirkung von einhundertprozentigem Kohlendioxid auf Tumorzellen und Medium auch zu Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration im Versuchsansatz kommen kann. Zwar ist das Nährmedium gepuffert (siehe Abschnitt 2.2.1, „Zellkultivierung“), jedoch ist fraglich, inwieweit die Pufferkapazität ausreicht, um die experimentellen Veränderungen zu kompensieren. Diese Einflüsse können im Tierversuch vernachlässigt werden, da dort die verschiedenen Mechanismen zur Regulation des Säure-Basen-Haushaltes zum Tragen kommen, wovon natürlich auch die Tumorzellen profitieren. Solche Regulationsmechanismen sind im In-vitro-Ansatz nicht gegeben.

Eventuelle Alterationen in der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums müßten daher nach Ende der CO₂-Exposition dann einen Wechsel des verbrauchten Mediums zur Folge haben, um eine dauerhafte Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und damit der Proliferationsfähigkeit zu vermeiden.

Nicht beeinflußt werden können dagegen die stoffwechselbedingten biochemischen Veränderungen im Zellinnern, auf welche die Versuchsbedingungen ebenfalls Einfluß nehmen. Sie müssen stets als gegebene - jedoch unbekannte - Größe hingenommen werden.

Zusätzlich werden zur Ergänzung der Hauptversuche für jeden Zelltyp zwei verschiedene Referenzmessungen durchgeführt. Sinn und Zweck der ersten dieser Messungen ist es zu ermöglichen, von den photometrisch gewonnenen DNA-Fluoreszenzwerte auf die entsprechenden realen Zellzahlen rückschließen zu können. Im Rahmen der zweiten Messung soll die basale Proliferation der zu untersuchenden Zellen über die Dauer des Beobachtungszeitraums bestimmt werden, einmal ausgehend von einer Zahl von 5.000 Zellen pro Loch, zum zweiten mit einer Ausgangszahl von 10.000 Zellen pro Loch. Dies dient dazu, die in den später durchzuführenden Hauptversuchen gewonnenen Ergebnisse korrekt interpretieren zu können. Nähere Einzelheiten zu diesen beiden Referenzmessungen folgen in Abschnitt 2.2.4.

Als Vorversuche werden nach erfolgter iso- und hyperbarer Zellbehandlung mit Kohlendioxid zum einen eine lichtmikroskopische Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer, zum anderen eine Messung der pH-Werte von Mediumproben, nachdem diese mit Kohlendioxid unter den verschiedenen Drücken behandelt worden sind, durchgeführt.

Die Konzeption der ersten der beiden Experimente lehnt sich an den Versuchsaufbau Jacobis an. Dieser behandelte in einem seiner in (122) beschriebenen Versuche Zellen des Ratten-Colon-Adenokarzinoms DHD/K12/TRb mit Kohlendioxid und Helium im Falle der Experimentalgruppen sowie Raumluft im Falle der Kontrollgruppe. Der Gasdruck lag in allen drei Fällen zwischen null und einem Millimeter Quecksilbersäule, entsprechend den isobaren Druckverhältnissen, wie sie auch in den hier zu beschreibenden eigenen Experimenten zu finden sind. Die Expositionszeit belief sich in Jacobis Versuchsansatz stets auf drei Stunden. Insgesamt wurden pro Tag und Gruppe 15 Ansätze mit jeweils 10^4 Zellen pro Ansatz mit Acridin Orange angefärbt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Bestimmung der Zahl der vitalen und der seit der CO_2 -Exposition nekrotisch gewordenen und damit avitalen Zellen in der NEUBAUER-Zählkammer.

Das hier im folgenden zu beschreibende eigene Experiment dient der partiellen Reproduktion der Ergebnisse aus diesem Versuch Jacobis. Dessen Ansatz wurde, soweit dies nach Maßgabe der eigenen Intention notwendig war, modifiziert. Entsprechend kommt zwar als Methode ebenfalls die einfache Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer zur Anwendung. Abweichend von Jacobis Ansatz, kommen hier jedoch die bereits vorgestellten humanen Karzinomzellen zum Einsatz. Die Anfärbung der Zellen erfolgt hier anstatt mit Acridin Orange mit Trypanblau. Die Mikroskopie wird entsprechend mit einem normalen Lichtmikroskop durchgeführt.

Der zweite der Vorversuche hat zum Ziel aufzuklären, inwieweit der Einfluß von Kohlendioxid alleine sowie die Drücke, unter denen dieses in den Versuchen mit hyperbarer CO_2 -Behandlung steht, am isolierten Medium zu Veränderungen der pH-Werte der Nährlösung führen können. Dies dient erstens der Abschätzung der Pufferkapazitäten der Lösung und der Belastung, der die Zellen während der Expositionszeit ausgesetzt sind. Zweitens soll hierdurch die Frage beantwortet werden, ob nach abgeschlossener Behandlung mit Kohlendioxid ein Wechsel des Nährmediums erforderlich ist.

2.2.3.1 Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer

Zunächst werden die Zellen in den 75-cm²-Kulturflaschen mit 10 ml PBS ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gespült und nach dem Abgießen des PBS mit 5 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) je Flasche für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Suspension mit den durch das Trypsin vom Flaschenboden abgelösten Zellen wird anschließend mit weiteren 5 ml Medium verdünnt, in 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.400 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand über dem Sediment wird abgegossen, und das Sediment selbst wird mit 1 ml Nährmedium resuspendiert. Es muß nun zunächst die Konzentration der vitalen Zellen in der jetzt vorliegenden Suspension bestimmt werden. Dies geschieht – nach gründlichem Durchmischen der Suspension – durch die Entnahme einer Probe von 10 µl, welche mit 90 µl Trypanblau (Sigma SteinSteinheim) gründlich vermischt wird. Die NEUBAUER-Zählkammer wird dann mit 10 µl dieser Suspension beschickt. Anschließend werden die Zellen in den vier Quadranten der Kammer unter dem Lichtmikroskop getrennt ausgezählt. Durch die Markierung mit Trypanblau imponieren die vitalen Zellen im mikroskopischen Aspekt tief dunkelviolett angefärbt und gut begrenzt, wohingegen die nekrotischen Zellen blaß und schlecht begrenzt erscheinen. Dies gestattet auch schon in der Phase der Versuchsvorbereitung die Unterscheidung zwischen vitalen und avitalen Zellen und ermöglicht es damit, selektiv nur die noch vermehrungsfähigen Zellen für die weitere Verarbeitung zu berücksichtigen.. Die Möglichkeit der Trennung der vitalen von den avitalen Zellen auch schon bevor sie dem Kohlendioxid ausgesetzt worden sind, ist insofern von praktischer Bedeutung, als auch in einer ungestörten Zellkultur physiologische Apoptoseprozesse ablaufen, so daß auch hier stets ein Teil nekrotischer Zellen zu erwarten ist, welcher für die weiteren Versuche jedoch unbrauchbar ist. Bei einem Intervall von durchschnittlich fünf bis sechs Tagen zwischen zwei Trennungen liegt dieser natürliche Anteil an nekrotischen Zellen sowohl für CX-2 als auch für DAN-G erfahrungsgemäß bei etwa ein bis zwei Prozent.

Nach dem Auszählen wird der Mittelwert der Einzelergebnisse gebildet. Ein Zehntel der durchschnittlichen Zellzahl aus allen vier Quadranten entspricht der Konzentration in Millionen Zellen pro Milliliter. Die Suspensionen von CX-2 und DAN-G werden nachfolgend mit den entsprechenden Mengen des Nährmediums bis auf die stets als Ausgangswert einzustellende Standardkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter verdünnt.

In der Planung für diesen Vorversuch sind fünf Tage als Beobachtungszeitraum vorgesehen. Pro Tag und Gruppe sollen weiterhin jeweils fünf Werte ausgezählt werden. Zudem soll eine Zählung am Tag null unmittelbar nach der Behandlung mit Kohlendioxid erfolgen, um über einen Ausgangswert zu verfügen, auf welchen die Werte der späteren Tage bezogen werden können. Entsprechend werden pro Tag, Druck und Zelllinie jeweils fünf 25-cm²-Kulturflaschen vorbereitet (*Abbildung 2*).

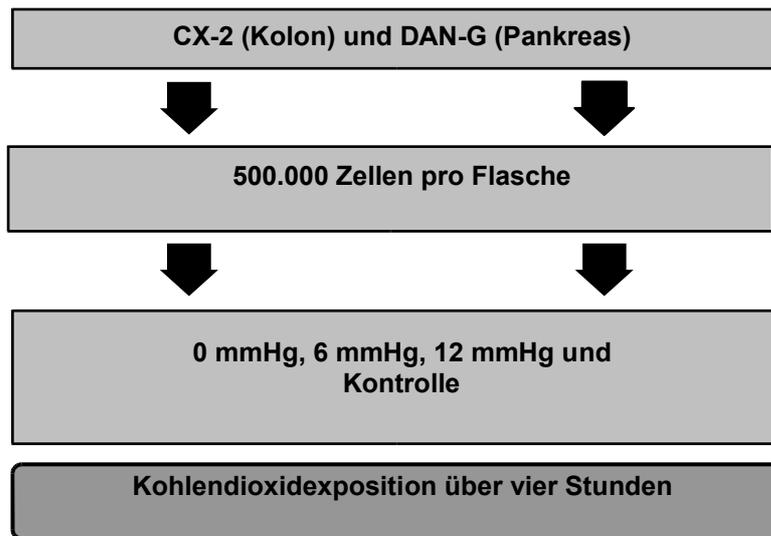


Abbildung 2: Versuchsanordnung zur Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer

Jede dieser Kulturflaschen wird mit $0,5 \cdot 10^6$ Zellen befüllt, welche in jeweils 5 ml Nährmedium suspendiert sind. CX-2 und DAN-G zeichnen sich gegenüber der Ratten-Tumorzelllinie DHD/K12/TRb durch eine wesentlich längere Populationsverdoppelungszeit (in beiden Fällen etwa dreißig Stunden) aus. Dies macht die zehnfach höhere Ausgangszellzahl im Vergleich zu den Versuchen Jacobis erforderlich. Nach der Verteilung auf die Kulturflaschen benötigen die Zellen beider Linien etwa 24 Stunden, um an den Kulturflaschenböden adhären zu werden.

Die Behandlung der hierfür vorgesehenen Zellen mit Kohlendioxid wird daher erst am Folgetag nach dem bereits beschriebenen Schema durchgeführt. Entsprechend ist unmittelbar am Behandlungsbeginn eine Ausgangszellzahl zu erwarten, die größer ist als die am Vortag eingestellte Zahl von $0,5 \cdot 10^6$ pro Flasche. Auch aus diesem Grund ist die Auszählung eines Nullwertes als Referenz für die späteren Zählungen unmittelbar nach Ende der CO_2 -Exposition angezeigt.

Der obligate Mediumwechsel nach Abschluß der Behandlung erfolgt mit Volumina von fünf Millilitern für jede Flasche. Die Behandlung der Kontrollgruppenzellen ist hierbei dieselbe wie die der Kohlendioxidgruppenzellen.

Unmittelbar nach der Behandlung mit Kohlendioxid am „Tag Null“ selbst sowie an den Tagen 1-5 werden die Zellen in den hierfür vorgesehenen Flaschen ausgezählt. Zur Vorbereitung für die Zählung werden die Zellen wieder mit PBS ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gespült und durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin-EDTA (Pan-Systems) vom Flaschenboden gelöst. Diese Suspension wird wieder mit jeweils 5 ml Medium verdünnt und bei 1.400 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren des Sediments mit 1 ml des Nährmediums erfolgt die Bestimmung der Zahl der vitalen Zellen der jeweiligen Tagesgruppe in der NEUBAUER-Zählkammer nach der oben beschriebenen Methode. Es werden zum einen die Werte der drei verschiedenen Kohlendioxidgruppen mit denen der Kontrollgruppe, zum anderen die Werte der Kohlendioxidgruppen untereinander verglichen. Die statistische Auswertung der Zählergebnisse beinhaltet neben der Varianz und Standardabweichung den Whitney-Mann-Wilcoxon-U-Test für die Einzelvergleiche sowie den Kruskal-Wallis-Test und den Dunn-Test mit alpha-Korrektur nach Holm für die Gruppenvergleiche. Für

die Kreuzvergleiche kommt der Wilcoxon-matched-pairs-Test zur Anwendung. Werte unterhalb des mit $\alpha = 0,05$ angesetzten Niveaus werden als signifikant angesehen.

2.2.3.2 pH-Wert-Bestimmungen

In einem weiteren Zusatzversuch soll der Einfluß des Kohlendioxids auf den pH-Wert des Nährmediums der Zellen während der Behandlung mit Kohlendioxid bestimmt werden. Hierzu werden wieder vier Gruppen gebildet. Eine Gruppe dient als Kontrolle. Die anderen drei Gruppen bestehen aus dem mit Kohlendioxid unter den drei bekannten Drücken zu behandelnden Medium.

Um eine Beeinflussung der pH-Wert-Veränderung durch saure Produkte aus dem Zellstoffwechsel zu vermeiden, soll ausschließlich das Medium mit Kohlendioxid behandelt werden. Hierzu wird dieses in jeweils fünf 75-cm²-Kulturflaschen gefüllt. Auch hier sind die Verschlüsse mit einem Filter versehen, um eine Kontamination der Ansätze zu vermeiden. Jede Flasche wird mit 10 ml Nährmedium befüllt. Die CO₂-Behandlung wird analog dem Procedere bei der Zellbehandlung durchgeführt. Nach dem Einsetzen der Kulturflaschen in die Insufflationskästen werden diese also zunächst mit 15 Litern Kohlendioxid gespült, bevor dann die verschiedenen Drücke eingestellt werden. Auch bei diesem Versuch wird stündlich das Gas abgelassen und nach erneutem Spülen der Kästen mit ebenfalls 15 Litern CO₂ der einzustellende Druck neu aufgebaut, um ein operatives Pneumoperitoneum zu simulieren. Die gesamte Expositionszeit beläuft sich auf vier Stunden. Die Behandlung mit Kohlendioxid erfolgt ebenfalls im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37° C. Die Flaschen mit dem Kontrollmedium bleiben – analog der Behandlung der Kontrollgruppenzellen in den übrigen Versuchen – während der Einwirkzeit des Kohlendioxids außerhalb der Insufflationskästen und des Wärmeschranks unter Raumluftbedingungen.

Nach Ablauf der Einwirkungszeit des CO₂ wird das Medium der verschiedenen Flaschen – also das der Kontrollgruppe ebenso wie das der drei CO₂-Gruppen – in entsprechend beschriftete Bechergläschen abgegossen. Es folgt die Bestimmung des pH-Wertes der verschiedenen Ansätze mit einem digitalen pH-Meter. Der Wert einer jeden Probe wird dann abgelesen, wenn die Anzeige mindestens sieben Sekunden unverändert geblieben ist. Es werden somit also je Gruppe fünf verschiedene Werte erhalten. Aus diesen werden die statistischen Basisgrößen Mittelwert, Varianz, Standardabweichung sowie die Signifikanzwerte mit Hilfe des F-Tests, des Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Tests, des Kruskal-Wallis-Tests und des Dunn-Tests mit der Alpha-Korrektur nach Holm ermittelt.

2.2.4 Hauptversuche

2.2.4.1 *Nekrosefärbung mit Propidium-Iodid*

Bereits im Verlauf der einfachen Zellzählungen in der NEUBAUER-Zählkammer im Rahmen der Vorversuche ergeben sich Hinweise darauf, daß die isobare ebenso wie die hyperbare Behandlung der Zellen von CX-2 und DAN-G mit Kohlendioxid zu einer erhöhten Rate an Nekrosen in den Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe führt (S. 31 ff.). Dieser Verdacht stellt sich aufgrund der im Aspekt des mikroskopischen Bildes deutlich erhöht scheinenden Anzahl blaßviolett angefarbter Zellen, was als Zeichen des zuvor erfolgten Zellniedergangs zu werten ist. Das Ausmaß an den zu beobachtenden Nekrosen scheint dabei auch von der Höhe des eingestellten Kohlendioxid drucks abzuhängen. Im Rahmen der Vorversuche wird dieser Beobachtung nicht weiter nachgegangen, da die Methode der mikroskopischen Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer nicht hinreichend genau scheint, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. Die Objektivierung und die Quantifizierung der vermuteten zytotoxischen Effekte von Kohlendioxid und Druck sollen vielmehr mit molekularen Mitteln erfolgen. Als sehr sensitive Methode bietet sich hierfür die Anfärbung der nekrotischen Zellen mit Propidium-Iodid und die nachfolgende Messung im Durchflußzytometer (FacScan, Becton Dickinson) an.

Die Methode der Markierung von DNA mit Propidiumiodid ist ein seit längerem etabliertes Verfahren unter anderem zur Detektion und Differenzierung von nekrotischen und apoptotischen Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie (123, 124, 125, 126). In Kombination mit Bromdesoxyuridin können des weiteren im Sinne einer Gegenfärbung Zellen in den verschiedenen Phasen ihres Replikationszyklus markiert werden. Dieses Verfahren hat sich im Rahmen von Zellzyklusanalysen ebenfalls bereits bewährt (123, 127, 128). Dabei kommt der S-Phasen-Bestimmung nicht nur unter experimentellen Bedingungen eine Bedeutung zu. Kitagawa et al. (129) konnten in einer klinischen Studie zeigen, daß der Höhe der S-Phasen-Fraktion innerhalb eines Tumors eine prognostische Bedeutung hinsichtlich der Überlebensrate von Patienten mit einem primären kolorektalen Karzinom zukommt. Für die hier gegebene Fragestellung ist jedoch die Differenzierung in apoptotische und nekrotische Zellen ebenso wie die differenzierte Zellzyklusanalyse von untergeordneter Bedeutung. Daher kann sich an dieser Stelle auf die einfache Färbung der Tumorzell-DNA mit Propidiumiodid beschränkt werden.

Die in den 75-cm²-Kulturflaschen (Falcon Primaria®) angezüchteten Zellen werden mit 10 ml PBS Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gewaschen und nach dem Abgießen des Puffers mit 5 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) fünf Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit sind die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst und liegen in einer Suspension vor, welche mit weiteren 5 ml Medium verdünnt und in 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt wird. Anschließend werden die Zellen fünf Minuten lang mit 1.400 U/min zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes erfolgt wieder die Resuspendierung der Zellen von CX-2 und DAN-G in dem jeweiligem Sediment mit einem Milliliter Medium für die nachfolgende Konzentrationsbestimmung in der NEUBAUER-Zählkammer. Es ist bei diesem Versuch in ganz besonderer Weise darauf zu achten, daß der Anteil an a priori nekrotischen Zellen möglichst gering gehalten wird, da diese ansonsten das spätere Versuchsergebnis verfälschen würden. Deswegen werden für die vor den Versuchen liegenden zwei Wochen kürzere Kulturintervalle gewählt, als dies sonst üblich ist. Liegen die Intervalle üblicherweise bei etwa sechs bis

sieben Tagen, werden diese hier auf drei Tage verkürzt. Das Wachstum in den Kulturflaschen wird zudem engmaschig durch tägliche mikroskopische Inspektion der Zellen kontrolliert. Hierdurch wird einem Überwachsen der Kulturflaschen vorgebeugt. In einem solchen Fall würde der Anteil nekrotischer Zellen stark ansteigen. Auch bei der Auszählung in der Zählkammer werden nur die vitalen Zellen berücksichtigt. Nur diese werden letztlich am Kulturflaschenboden adhären. Mit in die Flasche gelangende nekrotische Zellen werden dann beim nächsten Spülen des Zellrasens nach Abschluß der CO₂-Behandlung aus der Population eliminiert.

In Kenntnis der zuvor in der Zählkammer ermittelten Ausgangskonzentrationen von CX-2 und DAN-G werden nun wieder die 1-Milliliter-Stammsuspensionen mit Medium aufgefüllt, bis für jeden Zelltyp die Standardkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter erreicht ist. Für diese Versuche werden eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle sowie die Ansätze für die verschiedenen Drücke benötigt (*Abbildung 3*).

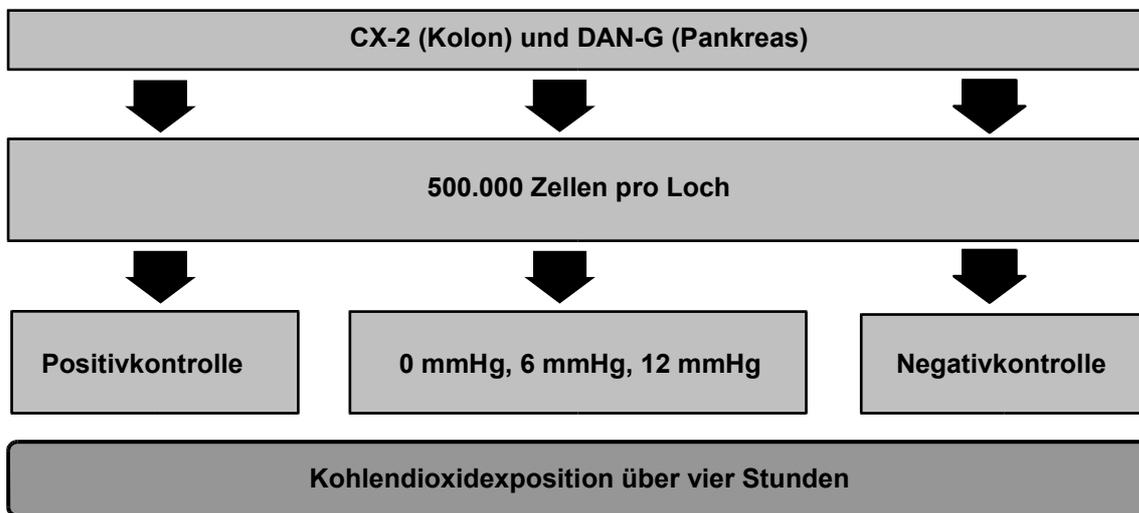


Abbildung 3: Versuchsanordnung zur Färbung nekrotischer Zellen mit Propidiumiodid

Die Negativkontrollen entsprechen den üblichen Kontrollgruppen, bestehend aus unbehandelten Zellen, die während der Expositionszeit außerhalb der Insufflationskästen unter Raumluftbedingungen gehalten werden. Die Positivkontrollen bestehen dagegen gänzlich aus mit Formalin abgetöteten Zellen. Der hier zu erwartende Anteil an nekrotischen Zellen beträgt damit einhundert Prozent.

Für jeden Ansatz sollen Werte aus sechs Stichproben bestimmt werden. Daher kommen sechs-Loch-Platten (Falcon Primaria®) zum Einsatz. Deren Löcher werden mit jeweils $0,5 \cdot 10^6$ Zellen von CX-2 bzw. DAN-G besetzt. Dies entspricht einem Volumen von 0,5 ml der Standardsuspension. Anschließend werden die Löcher mit weiteren 2 ml Medium aufgefüllt. Da die Zellen am Folgetag mit Kohlendioxid behandelt und unmittelbar danach allesamt weiterverarbeitet werden, kann bei diesem Versuch auf die Zugabe eines Antibiotikums zum Medium verzichtet werden.

Die Zellen können zunächst während der ersten vierundzwanzig Stunden an den Böden der Löcher adhären. Am nächsten Tag werden die Zellen in den Löchern aller Platten mikroskopiert. Damit soll deren Adhärenz noch einmal im Einzelnen überprüft

werden, da nur am Boden anhaftende Zellen weiterverarbeitet werden können. Nach positivem Befund erfolgt in allen Platten, sowohl denen der Gas- als auch denen der beiden Kontrollgruppen, ein kompletter Mediumwechsel. Damit soll vor allem für die Zellen der Gasgruppen wieder ein möglichst optimaler Ausgangszustand für die folgende Exposition gegenüber dem sauren Milieu in den Insufflationskästen geschaffen werden. Nach gründlicher Desinfektion der Kästen werden diese mit den Platten der jeweiligen Gasgruppenzellen besetzt und danach luftdicht verschlossen. Nacheinander erfolgt nun die Behandlung der Zellen der isobaren, der sechs-Millimeter-Quecksilbersäule- und der zwölf-Millimeter-Quecksilbersäule-Gruppen mit Kohlendioxid unter den entsprechenden Drücken über vier Stunden. Die Vorgehensweise zum Einstellen des Gases entspricht der oben geschilderten: Zunächst werden die Einlaßstutzen der Kästen mit dem Insufflator verbunden, während der Auslaß noch offen bleibt. Dann erfolgt das Auswaschen der Raumluft aus den Kästen durch Spülen mit 15 Litern Kohlendioxid bei maximaler Gasflußrate. Jetzt ist eine CO₂-Konzentration von einhundert Prozent erreicht, was die Voraussetzung dafür ist, daß nun der Gasfluß auf 1 l*min⁻¹ reduziert, der gewünschte Druck am Insufflator eingestellt und schließlich auch der Auslaß im Falle der hyperbaren Kohlendioxid-Exposition verschlossen werden kann. Zur Gewährleistung des isobaren Druckes bleibt der Auslaß wie gewohnt offen. Die Expositionszeit beträgt auch bei diesen Versuchen vier Stunden. Nach jeder vollen Stunde erfolgt bei allen drei Drücken das erneute Durchspülen der Kästen mit fünfzehn Litern frischem Kohlendioxid bei offenem Auslaß mit maximaler Gasflußrate. Anschließend folgt der erneute Druckaufbau für die hyperbaren Versuche. Im Falle der isobaren Versuche wird statt dessen die Flußrate wieder auf einen Liter pro Minute reduziert.

Nach Ablauf der vierstündigen Expositionszeit wird das Medium aus allen Löchern entfernt, und die darin befindlichen Zellen aller Gruppen werden mit jeweils 5 ml PBS Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gewaschen. Nach Entfernung des Spülpuffers schließt sich die fünfminütige Inkubation der Zellen mit Trypsin-EDTA (Pan-Systems) bei einem Volumen von 2 ml pro Loch im Brutschrank an. Die hierdurch erhaltene Trypsin-EDTA-Zellsuspension wird analog der in anderem Zusammenhang bereits geschilderten Vorgehensweise mit weiteren 2 ml Medium verdünnt und dann in 5-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt. Die folgende Zentrifugation dauert wieder fünf Minuten bei 1.400 U/min. Anschließend wird der Überstand abgegossen. Das Resuspendieren der Zellen im Sediment erfolgt für alle Gruppen mit 1 ml Medium. Die weitere Behandlung der Zellen im Sediment unterscheidet sich nun in Abhängigkeit von den Erfordernissen, die durch die verschiedenen Gruppenzugehörigkeiten gegeben sind. Die Zellen der Positivkontrollen werden zunächst vollständig abgetötet. Dies geschieht durch eine fünfzehnminütige Inkubation mit zwei Milliliter zehnprozentigem Formalin bei Raumtemperatur. Diese Behandlung ist ausschließlich den Zellen der Positivkontrollen vorbehalten und unterbleibt für die Negativkontrollen und die Gasgruppenzellen. Der nächste Schritt stellt die gemeinsame Endstrecke für nun wieder alle Zellen dar. Er besteht in der Fluoreszenzmarkierung der durch die Inkubation mit Formalin bzw. durch die Einwirkung des Kohlendioxids nekrotisch gewordenen Zellen. Zu diesem Zweck wird ein Milliliter Propidium-Iodid (Sigma München) zu den Suspensionen zugegeben, welche dann für weitere fünfzehn Minuten im Brutschrank inkubiert werden. Bei diesem letzten Arbeitsschritt vor der definitiven Messung ist darauf zu achten, daß - ebenso wie in jedem anderen Fall einer Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen - im verdunkelten Raum gearbeitet wird, um einen Fluoreszenzverlust durch vorzeitige Belichtung des Reagens und damit spätere falsch-negative Meßergebnisse zu vermeiden.

Nach beendeter Inkubation erfolgt die Messung der Zellen im Durchflußzytometer (Fac Scan, Becton Dickinson). Wie bereits bei der Zellzyklusbestimmung, werden auch hier wieder pro Ansatz und Meßvorgang jeweils 10.000 Zellen analysiert und die Größen der verschiedenen Fraktionen relativ als Prozentwerte ausgewiesen.

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse umfaßt neben Varianz und Standardabweichung den Welch-t-Test für die Einzelvergleiche sowie den Kruskal-Wallis-Test und den Dunn-Test mit alpha-Korrektur nach Holm für die Gruppenvergleiche. Werte unterhalb des mit $\alpha = 0,05$ angesetzten Niveaus werden als signifikant angesehen.

2.2.4.2 *Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green*

Die Bestimmung des Proliferationsverhaltens der mit Kohlendioxid behandelten Zellen der Kontrollgruppe erfolgt mittels Markierung der Tumorzell-DNA mit Pico Green als fluoreszierendem Farbstoff und der nachfolgenden Messung der Fluoreszenz im UV-Photometer. Diese Methode bietet sich an, da sie leicht anzuwenden ist, bei gegebenem Aufwand die einfache Bearbeitung einer großen Zahl an Stichproben ermöglicht und sich darüber hinaus dank der ausgeprägten selektiven Affinität gegenüber Desoxyribonukleinsäure durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet.

Nach Abgießen des Mediums werden die Zellen zuerst in den 75-cm²-Kulturflaschen (Falcon Primaria®) mit jeweils 10 ml PBS-Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gewaschen. Nach Abgießen des Spülpuffers und Zugabe von jeweils 5 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) werden die Zellen dann fünf Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Anschließend sind die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und liegen in einer Suspension vor, welche mit weiteren 5 ml Medium verdünnt und in 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt wird. Hierin erfolgt eine fünfminütige Zentrifugation mit 1.400 U/min, nach deren Ende der Überstand abgegossen und das Sediment mit einem Milliliter Medium resuspendiert wird. Ausgehend von dieser Suspension, erfolgt die Bestimmung der Ausgangskonzentration der Zellen von CX-2 und DAN-G. Hierfür wird von jedem Ansatz eine 10- μ l-Probe entnommen und mit weiteren 90 μ l Trypanblau (Sigma Steinheim) gründlich vermischt. Von dieser Suspension werden 10 μ l auf die NEUBAUER-Zählkammer gegeben. Die Auszählung erfolgt für jeden der vier Quadranten einzeln. Danach wird das arithmetische Mittel aus den vier Einzelwerten gebildet. Ein Zehntel des erhaltenen Betrages entspricht der Zellkonzentration in Millionen Zellen pro Milliliter. In Kenntnis dieser Ausgangskonzentration werden die Stammsuspensionen von CX-2 und DAN-G mit den fehlenden Volumina an Medium bis zum Erreichen der Standardkonzentration von einer Million Zellen pro Milliliter aufgefüllt. Ausgehend von dieser Standardkonzentration erfolgt die weitere Verdünnung auf die für die einzelnen Ansätze benötigten Zellkonzentrationen. Das für diese Versuche verwendete Medium enthält als Zusatz die Antibiotika Penicillin und Streptomycin in einer Konzentration von 10 U/ml. Als Beobachtungszeitraum sind fünfzehn Tage vorgesehen. Messungen sollen für die Tage 1-5 sowie für die Tage 7, 9, 11, 13 und 15 im Anschluß an die Behandlung mit Kohlendioxid erfolgen. An jedem Tag sollen pro Zelllinie und Gruppe (also isobare und hyperbare Drücke sowie Kontrollgruppe) Werte aus zwanzig Stichproben ermittelt werden. Als Kulturgefäße für diese Versuchsreihe bieten sich daher 96-Loch-Platten (Falcon Primaria®) an. Aufgrund der großen Zahl an auf einer Platte zur Verfügung stehenden Löcher können alle Zellen eines Tages und Druckes sowohl von CX-2 als auch von DAN-G auf einer Platte untergebracht werden.

An eine geeignete Zellzahl für die einzelnen Löcher sind zwei Forderungen zu stellen: Zum einen müssen bereits am ersten Tag genügend Zellen vorhanden sein, damit es nicht zu Diskrepanzen zwischen der Sensitivität der Meßmethode einerseits und der Zellzahl andererseits kommt. Zum anderen darf die Ausgangszellzahl in den Löchern jedoch nicht so groß sein, daß es bereits vor dem Ende des Beobachtungszeitraumes zu ei-

nem Überwachsen der Löcher kommt, was die zu messende Proliferation der Tumorzellen verfälschen würde. Für die gesamte Dauer des gewählten Beobachtungszeitraumes kann keine Zellzahl gefunden werden, die geeignet wäre, beide Forderungen zugleich zu erfüllen. Es müssen somit für die ersten fünf Tage höhere Zellzahlen in die Löcher eingesetzt werden als für die Tage 7-15 des späten Beobachtungszeitraumes. Im ersten Fall werden daher in

jedes Loch 5.000 Zellen eingebracht. Im letzten Fall wird diese Zahl auf 1.000 reduziert (Abbildung 4). Da – wie eingangs erwähnt - die Kulturintervalle und die Verdoppelungszeiten für CX-2 und DAN-G nahezu identisch sind, können für beide Linien dieselben Zellzahlen pro Loch gewählt werden.

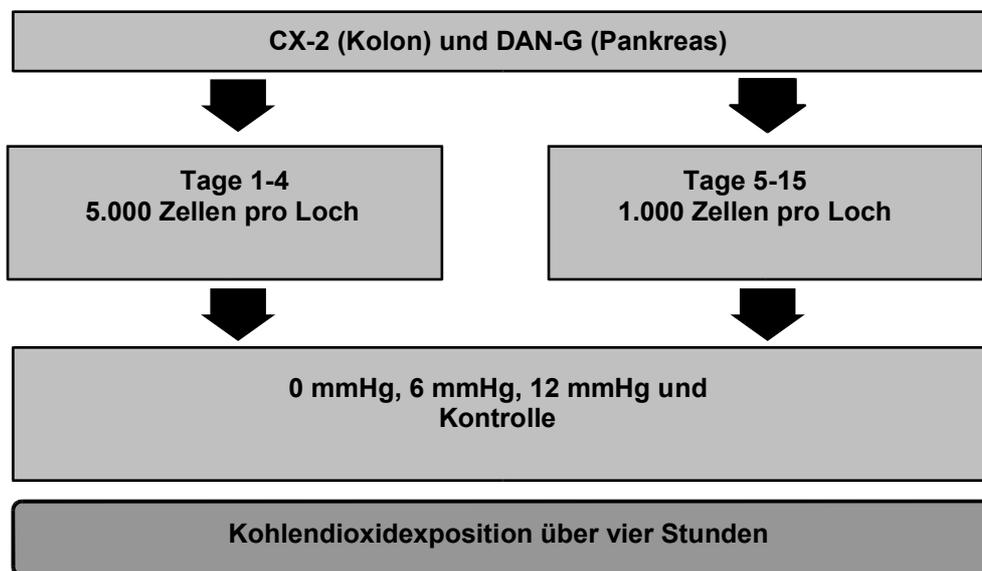


Abbildung 4: Versuchsanordnung zur quantitativen DNA-Bestimmung mit Pico Green

Für die Platten der ersten fünf Tage muß daher die Standard-Suspension mit der Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter weiter verdünnt werden. Dies erfolgt bis zu einer Endkonzentration von 100.000 Zellen pro Milliliter. Damit entspricht der für die ersten fünf Tage vorgesehenen Zahl von fünftausend Zellen pro Loch ein Suspensionsvolumen von 50 μ l. Dies liegt noch innerhalb des Bereichs, in dem die verwendeten Pipetten (Eppendorf Combitips) genau arbeiten. Niedrigere Volumina führen jedoch zu einer abnehmenden Pipettiergenauigkeit, weswegen die bestehende Suspension für die Zahl von 1.000 Zellen pro Loch weiter verdünnt werden muß. Diese Verdünnung erfolgt um den Faktor fünf auf eine Konzentration von 20.000 Zellen pro Milliliter. Damit entsprechen nun 1.000 Zellen wiederum einem Suspensionsvolumen von 50 μ l. Alle mit Zellen besetzten Löcher werden anschließend mit jeweils 200 μ l Medium bis auf ein Gesamtvolumen von 250 μ l aufgefüllt. In den folgenden vierundzwanzig Stunden haben die Zellen Gelegenheit, am Boden der Löcher adhären zu werden. Die Adhärenz wird am Folgetag unmittelbar, bevor die Zellen für die CO₂-Behandlung vorbereitet werden, durch Begutachtung der Platten unter dem Mikroskop überprüft.

Zur Vorbereitung der CO₂-Behandlung werden die Insufflationskästen zunächst gründlich desinfiziert, um eine Infektion der Zellen in den Platten zu verhindern. Das Risiko hierfür ist im Vergleich zur in Kulturflaschen erfolgenden Exposition der Zellen gegenüber dem Kohlendioxid erhöht, da die Mikrotiterplatten im Gegensatz zu den Flaschen nicht keimdicht verschlossen werden können. Dies ist auch der Grund für die Zugabe des oben erwähnten Antibiotikums, die bei der Verwendung von Kulturflaschen unterbleiben kann.

Nach der Desinfektion werden die Platten mit den Zellen der CO₂-Gruppen in die Kästen gelegt, welche anschließend fest verschlossen und in den Inkubator eingesetzt werden. Der Inkubator ist ein reiner Wärmeschrank ohne das Gas-Luft-Gemisch, das im Brutschrank für die Zellkultivierung zu finden ist. In seinem Inneren befindet sich statt dessen Raumluft, die mittels eines Thermostates auf einer konstanten Temperatur von 37° C gehalten wird. Die Platten mit den nicht zu behandelnden Zellen der Kontrollgruppe befinden sich ebenfalls im Inkubator, verbleiben jedoch außerhalb der Kästen in Raumluftumgebung. Nach dem ordnungsgemäßen Einsetzen aller Platten und Kästen in den Wärmeschrank wird der Einlaßstutzen der Kästen mit dem Insufflator (Aesculap) verbunden, während der Auslaß noch geöffnet bleibt. Am Insufflator wird die maximale Flußrate eingestellt, und die Kästen werden mit insgesamt 15 Litern reinem Kohlendioxid gespült, um die Raumluft komplett aus deren Innern zu entfernen. Nach diesem Spülvorgang wird die Flußrate auf einen Liter pro Minute reduziert. Der gewünschte Druck von null, sechs oder zwölf Millimeter Quecksilbersäule kann nun eingestellt werden. Abschließend wird im Falle der hyperbaren CO₂-Behandlung auch der Auslaß der Kästen verschlossen, um einen Druckverlust zu verhindern. Bei der Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid unter Atmosphärendruck bleibt der Auslaß offen, so daß die Zellen kontinuierlich mit dem Gas beströmt werden. Nach jeder vollen Stunde wird der Auslaß geöffnet, damit unter maximalem Gasfluß die Kästen erneut mit 15 Litern Kohlendioxid gespült werden können. Danach werden die Auslaßöffnungen wieder verschlossen und erneut die gewünschten Drücke am Insufflator eingestellt. Am Ende der Exposition werden die Platten aus den Kästen genommen, und alle Zellen, auch die der Kontrollgruppe, erfahren einen Mediumwechsel. Anschließend erfolgt die Lagerung im Brutschrank. An den für die Proliferationsbestimmung vorgesehenen Tagen wird das Wachstum der betreffenden Zellen unterbrochen. Dies geschieht durch das vorsichtige Absaugen des Mediums aus den Löchern der fraglichen Platten. Durch die Einstellung eines minimalen Sogs kann das versehentliche Mitabsaugen von Zellen vermieden werden. Anschließend werden die Zellen dreimal mit frischem Medium gespült und anschließend durch Fönen getrocknet. Die so konservierten Zellen können nun bei Raumluftbedingungen mehrere Wochen ohne Nachteile gelagert werden. Dies hat den Vorteil, daß erst bei Vorliegen aller auszuwertenden Platten eine einzige Meßreihe vorbereitet werden muß. Alle für den Färbeprozess benötigten Reagenzien müssen daher in nur einem Ansatz zubereitet werden. Dies wiederum minimiert das Risiko von Meßfehlern durch mögliche Wäge- und Pipettierungenauigkeiten bei einer eventuell mehrfachen Zubereitung der Lösungen.

Zur Vorbereitung der DNA-Markierung wird durch Zugabe von Papain (Sigma Steinheim) das Andauen der Tumorzellmembranen eingeleitet. Das Papain liegt in einer im Vergleich zur Ausgangssubstanz um das Zweihundertfache verdünnten Lösung in einem Cysteinpuffer vor. Dieser Puffer besteht aus 500 ml PBS (Gibco BRL), in dem 0,439 g Cystein-HCL (Molmasse 1,756 g) und 0,930 g Natrium-EDTA (Molmasse 3,722 g) gelöst sind. Beide Substanzen liegen damit in einer Konzentration von 0,5 Mol pro Liter vor. Von der das Papain im Verhältnis 1:200 enthaltenden Lösung werden in jedes Zellen enthaltende Loch 100 µl gegeben. Anschließend müssen die anzudauenden Zellen in einem feuchtem Milieu vierundzwanzig Stunden lang bei einer Temperatur von 60° C inkubiert werden. Zur Herstellung dieses Milieus werden alle Platten zusammen mit einem Gefäß mit Wasser in Folien eingewickelt. Am folgenden Tag erfolgt die Markie-

rung der nach dem Verdau nun frei vorliegenden Tumorzell-DNA mittels Pico Green (Molecular Probes Oregon). Dieses liegt hierfür in einer Lösung vor, in welcher es um das Hundertfache verdünnt ist. Das Lösungsmittel ist hier ein TRIS/EDTA-Puffer, in welchem Tris-HCl in einer Konzentration von 10 Millimol pro Liter und Natrium-EDTA in einer Konzentration von einem Millimol pro Liter vorliegen müssen. Zur Herstellung dieses Puffers werden zunächst in 500 ml PBS (Gibco BRL) zuerst 1,2114 g Tris-HCl (Molmasse 121,14 g) sowie dann 3,722 mg Natrium-EDTA (Carl Roth KG Karlsruhe) mit einer Molmasse von 3,722 g gelöst.

Durch diese Vorgehensweise wird für Tris-HCl eine Konzentration von 20 Millimol pro Liter und für Natrium-EDTA eine Konzentration von zwei Millimol pro Liter erreicht. Pico Green wird hierin im Verhältnis 1:100 gelöst. Die angestrebte Endkonzentration, die in den Löchern vorliegen soll, beträgt jedoch - wie bereits erwähnt - 10 Millimol Tris-HCl und 1 Millimol Natrium-EDTA pro Liter. Pico Green soll in einer zweihundertfachen Verdünnung vorliegen. Von dem Pico Green enthaltenden Puffer werden ebenfalls 100 µl in jedes Loch gegeben. Da jedoch diese Löcher bereits dasselbe Volumen an Papain-Lösung enthalten, führt dies notwendigerweise zu einer Verdünnung des Cystein-Puffers und des Pico Green im Verhältnis 1:1, was einer Halbierung der hergestellten Konzentration entspricht. Daher müssen der Cystein-Puffer und das in ihm enthaltene Pico Green primär doppelt konzentriert werden, was durch Lösung der angegebenen Massen in dem Volumen von 500 ml PBS erreicht wird.

Bei der Zubereitung der Pico-Green-Lösung ist ferner daran zu denken, daß es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt. Dies bedeutet, daß mit ihm nur im abgedunkelten Raum gearbeitet werden darf, da es bei einer zu starken Lichtexposition zu einem Verlust an Fluoreszenz käme, was das spätere Meßergebnis verfälschen würde.

Die mit dem Markierungsstoff versetzten Zellen werden fünfzehn Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im Fluoreszenzphotometer mit einer Filtereinstellung von B/B 3 entsprechend einer Wellenlänge für die Exzitation von 485 nm und für die Emission von 520 nm.

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse umfaßt neben der Varianz und der Standardabweichung den Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Test für die Einzelvergleiche sowie den Kruskal-Wallis-Test und den Dunn-Test mit alpha-Korrektur nach Holm für die Gruppenvergleiche. Werte unterhalb des mit $\alpha = 0,05$ angesetzten Niveaus werden als signifikant angesehen.

2.2.5 Zusatzversuche

2.2.5.1 *Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz*

Bei der Färbung der Tumorzell-DNA mit Propidium-Iodid und deren nachfolgender Messung im Cytofluor werden dimensionslose Fluoreszenzwerte erhalten. Diese lassen keinen unmittelbaren Rückschluß auf die Zahl der wirklich vorhandenen Zellen zu. Über den Umweg einer Zellzahl-/Fluoreszenz-Standardkurve kann jedoch - wenn auch nur grob - von der photometrisch gemessenen Fluoreszenz auf die ursprüngliche Zellzahl zurückgerechnet werden. Dies hilft auch beim Vergleich der im Rahmen der quantitativen DNA-Bestimmung gewonnenen Ergebnisse mit den Resultaten aus den Vorversuchen mit der Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer.

Ausgangsmaterial sind wieder die in den 75-cm²-Kulturflaschen (Falcon Primaria®) angezüchteten Zellen von CX-2 und DAN-G. Diese werden nach Abgießen des Mediums aus den Flaschen mit 10 ml PBS-Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gewaschen. Nach dem Abgießen des Puffers werden in jede Flasche 5 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) gegeben, mit welchem die Zellen fünf Minuten lang im Kulturschrank inkubiert werden. Nach dieser Zeit sind die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Die Zell-Trypsin-EDTA-Suspension wird mit weiteren 5 ml Medium verdünnt, in 50-Milliliter-Falcon-Röhrchen überführt und fünf Minuten lang bei 1.400 U/min zentrifugiert. Nach dieser Zeit wird der Überstand aus den Röhrchen abgegossen, und das Sediment wird für die nun durchzuführende Konzentrationsbestimmung mit 1 ml Medium resuspendiert. Die nun folgenden Arbeitsschritte sind identisch mit der weiter oben bereits geschilderten Vorgehensweise: 10 µl der jeweiligen Suspension von CX-2 und DAN-G werden mit 90 µl Trypanblau (Sigma Steinheim) gründlich vermischt. Von dieser Suspension werden wiederum 10 µl in die NEUBAUER-Zählkammer gegeben. Jeder der vier verschiedenen Quadranten der Zählkammer wird für sich ausgezählt, wobei wieder nur die vitalen Zellen berücksichtigt werden. Anschließend wird der Mittelwert der vier Zählergebnisse berechnet. Ein Zehntel dieses Mittelwertes entspricht der Zellkonzentration in der 1-Milliliter-Suspension in Millionen Zellen pro Milliliter. In Kenntnis dieser Konzentration kann nun diese Suspension mit Medium auf die Standardausgangskonzentration von einer Million Zellen pro Milliliter aufgefüllt werden.

Die anzufertigenden Standardkurven von CX-2 und DAN-G sollen Fluoreszenzwerte entsprechend Zellzahlen von 5.000 bis 90.000 Zellen pro Loch liefern. In Anlehnung an den oben beschriebenen Versuchsansatz zur quantitativen DNA-Bestimmung mit Pico Green erfolgt das Ausbringen der Zellen auch hier auf 96-Loch-Platten (Falcon Primaria®), und zwar auf je eine Platte für jede Zelllinie.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	5.000 Zellen pro Loch	10.000 Zellen pro Loch	15.000 Zellen pro Loch	20.000 Zellen pro Loch	25.000 Zellen pro Loch	30.000 Zellen pro Loch	40.000 Zellen pro Loch	50.000 Zellen pro Loch	60.000 Zellen pro Loch	70.000 Zellen pro Loch	80.000 Zellen pro Loch	90.000 Zellen pro Loch

Abbildung 5: Verteilung der Zellen auf der 96-Loch-Platte für die Zellzahl-Fluoreszenz-Standardkurve

Nach Herstellen der geeigneten Verdünnungsreihen werden die acht Löcher der ersten Reihe der Platte mit jeweils 5.000 Zellen beschickt. Die Zellzahlen für die Löcher der folgenden Reihen steigen dann stetig an: 10.000 Zellen in den Löchern der zweiten Reihe, dann weiter 15.000, 20.000, 25.000 und 30.000 Zellen pro Loch bis zu Reihe sechs. Von Reihe sechs bis Reihe zwölf wird die Zellzahl dann in 10.000-Schritten gesteigert, so daß Reihe sieben 40.000 Zellen pro Loch enthält und Reihe zwölf schließlich 90.000 Zellen pro Loch (*Abbildung 5*). Alle Löcher werden anschließend mit Medium bis auf ein Volumen von 250 µl pro Loch aufgefüllt und für die folgenden 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit haben die Zellen Gelegenheit, am Boden der Löcher adhärent zu werden.

Nach Ablauf von 24 Stunden wird das Medium aus allen Löchern abpipetiert. Die Zellen werden dann dreimal mit neuem Medium gespült und anschließend durch Fönen getrocknet. Im nächsten Arbeitsschritt müssen nun die Zellmembranen aufgelöst werden, um die Reaktion zwischen der Tumorzell-DNA, welche hierzu frei vorliegen muß, und dem im letzten Schritt zuzugebenden Pico Green zu ermöglichen. Die Lysierung der Zellmembran erfolgt auf chemischem Weg mit Hilfe von Papain (Sigma Steinheim). Dieses wird zuvor im Verhältnis 1:200 in Cysteinpuffer verdünnt. Der Puffer besteht aus 500 ml PBS (Gibco BRL), in welchem zunächst 0,439 g Cystein-HCl entsprechend 5 Millimol (bei einem Molekulargewicht von Cystein-HCl von 1,756 g pro Mol) und 0,930 g Natrium-EDTA (Carl Roth KG Karlsruhe) entsprechend ebenfalls 5 Millimol (bei einem Molekulargewicht von Natrium-EDTA von 3,722 g) gelöst sind. Cystein-HCl und Natrium-EDTA liegen damit in einer 0,5-molaren Lösung vor. In jedes der Löcher in den Falcon-Primaria®-Platten werden 100 µl dieser Papainlösung gegeben. Alle so behandelten Platten werden zusammen mit einem Gefäß mit Wasser in eine Folie eingewickelt und für die nächsten vierundzwanzig Stunden bei einer Temperatur von 60° C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Inkubation unterbrochen. Um die nun frei vorliegende Tumorzell-DNA zu markieren, bedarf es der Zugabe von Pico Green (Molecular Probes Oregon) als fluoreszierendem Farbstoff. Dieses liegt in Form einer Stammlösung vor, die zunächst um den Faktor 100 in TRIS/EDTA-Puffer verdünnt werden muß. Ein 500-Milliliter-Ansatz des Puffers setzt sich zusammen aus 1,2114 g Tris-HCl entsprechend einer Menge von 10 mM (Molekulargewicht von Tris-HCl = 121,14 g pro Mol) und 3,722 mg Natrium-EDTA (Carl Roth KG Karlsruhe), was bei einem Molekulargewicht von 3,722 g pro Mol einem Millimol entspricht. Diese Mengen werden in 500 ml PBS (Gibco BRL) gelöst. Hierin wird Pico Green im Verhältnis 1:100 gelöst. Dies ergibt zunächst das Doppelte der Konzentration, die später in den einzelnen Löchern vorliegen soll. Diese doppelte Konzentration muß jedoch deshalb gewählt werden, weil 100 µl des Puffers zur gleichen Menge der schon in den Löchern vorhandenen Papain-Lösung zugegeben werden und diese damit 1:1 verdünnt wird, was einer Halbierung der ur-

sprünglichen Konzentration entspricht. Diese Vorgehensweise ist damit identisch mit der im vorigen Kapitel geschilderten. Bei der Zubereitung der Pico-Green-Lösung ist wieder darauf zu achten, daß im verdunkelten Raum gearbeitet wird, da bei zu starker Exposition des Farbstoffs gegenüber Licht ein Fluoreszenzverlust eintreten kann, was das Meßergebnis verfälschen würde.

Die nun mit Pico Green versetzten Zellen werden fünfzehn Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im Cytofluor. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein mit ultraviolettem Licht arbeitendes Photometer. Die Filtereinstellungen sind variabel. Für die hier durchzuführenden Messungen lautet die Vorgabe B/B 3. Dies entspricht einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Das statistische Instrumentarium zur Auswertung der Meßresultate umfaßt neben Varianz und Standardabweichung den Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Test für die Einzelvergleiche sowie den Kruskal-Wallis-Test für die Gruppenvergleiche.

2.2.5.2 Plateaubestimmung

Bezüglich der Unterschiede in der Dynamik, die hinsichtlich der Proliferation der Zellen von CX-2 und DAN-G zu beobachten sind, können mehrere Ursachen vorstellbar sein. So kann es sich zum einen um echte Differenzen in der Proliferationskinetik handeln, die durch Stimulation oder Suppression der Tumorzellen unter den Experimentalbedingungen verursacht sein können. Weiterhin kommen zytotoxische Effekte des Kohlendioxids in Frage, die zudem vom eingestellten Gasdruck abhängig sein können und gegenüber denen die beiden Zelltypen auch unterschiedlich sensibel sein mögen. Was jedoch weiterhin in Erwägung gezogen werden muß, ist die Möglichkeit, daß gerade zu späteren Zeitpunkten der Beobachtungsperiode die Löcher - auch bei den für die späteren Tage reduzierten Ausgangszellzahlen - vollgewachsen sind und die darin befindlichen Zellen aufgrund des nun nicht mehr ausreichenden Raumes nur noch vermindert oder überhaupt nicht mehr proliferieren. Dies wäre, auch in Anbetracht der unter optimalen Bedingungen nahezu gleichen Proliferationskinetik von CX-2 und DAN-G, im Falle des Pankreaskarzinoms früher zu erwarten, da dessen Zellen deutlich größer sind als die des Colon-Adenokarzinoms. Hinzu kommen die verschiedenen Verteilungsmuster der Zellen in ihren Kulturgefäßen. So wachsen die Zellen von DAN-G als homogener, gleichmäßig über das gesamte Gefäß verteilter Rasen, die von CX-2 dagegen zusammengeballt in Form von einzelnen Kolonien.

Fertigte man eine Proliferationskurve an, so würde der Zustand der sistierenden Zellvermehrung als Plateau in den späten Tagen imponieren. Um die gewonnenen Meßergebnisse auch unter diesem Gesichtspunkt betrachten und bewerten zu können, ist es daher unerlässlich, eine Standard-Proliferationskurve sowohl für die Zellen des Colon-Adenokarzinom CX-2 als auch für die des Pankreaskarzinoms DAN-G anzufertigen. Nur so kann festgestellt werden, ab welchem Tag die Löcher in den Platten bei einer Ausgangszahl von 1.000 oder 5.000 Zellen pro Loch vollgewachsen sind und damit die Proliferationskurve vom Anstieg in das erwähnte Plateau übergeht.

Für die ersten fünf Tage im Rahmen der quantitativen DNA-Bestimmung mit Pico Green können in die Vertiefungen der 96-Loch-Platten jeweils 5.000 Zellen von CX-2 und DAN-G eingebracht werden, ohne daß man ein Überwachsen der Löcher am fünften Tag zu befürchten hätte. Spätestens am siebten Tag wäre jedoch unter Beibehaltung dieser Ausgangszellzahl mit genau einem solchen Überwachsen zu rechnen. Die Meßergebnisse wären damit nicht mehr verwertbar. Daher ist es notwendig, zu den späten Meßzeitpunkten ab Tag fünf die Ausgangszellzahl sowohl von CX-2 als auch von DAN-G auf

jeweils 1.000 Zellen pro Loch zu reduzieren. Auch bei der Anlage einer Proliferationskurve zur Plateaubestimmung für CX-2 und DAN-G muß diesem Sachverhalt Rechnung getragen werden. Der Versuchsaufbau umfaßt dementsprechend vier Ansätze: für CX-2 und DAN-G jeweils einen Ansatz mit einer Ausgangszahl von 1.000 Zellen pro Loch und einen Ansatz mit einer Ausgangszahl von 5.000 Zellen pro Loch. Meßzeitpunkte sind zum einen die vom Hauptversuch bereits bekannten Tage 1-4 für die 5.000-Zell-Ansätze, zum anderen die Tage 5-15 für die 1.000-Zell-Ansätze. Für die Plateaubestimmungen werden diese Zeiträume nun verlängert. So wird die Proliferation der Zellen aus dem frühen Ansatz bis zum neunten Tag, die der Zellen aus dem späten Ansatz bis zum zwanzigsten Tag beobachtet. Dies soll Ungewißheiten im Grenzbereich des letzten Tages der DNA-Bestimmung vermeiden. Denn falls sich der jeweils letzte Tag als der Tag herausstellen sollte, an welchem der Anstieg der Kurve endet und in die stationäre Phase übergeht, entzöge sich dieses der Beobachtung, wenn die Plateau-/Proliferationskurve bereits hier endete.

Als Kulturgefäße für die Versuche werden wieder die 96-Loch-Platten von Falcon-Primaria® verwendet. Für jeden Tag wird eine Reihe, entsprechend zwölf Löchern, mit den notwendigen Zellzahlen des jeweiligen Zelltyps befüllt. Hierbei entspricht der erste Tag der Messungen dem zweiten Tag nach dem Ausplattieren der Zellen auf die 96-Loch-Platten. Diese zeitliche Einteilung ist damit dieselbe wie die im zugrundeliegenden Hauptversuch, in welchem vierundzwanzig Stunden nach dem Ausplattieren die Kohlendioxid-Exposition und weitere vierundzwanzig Stunden später die erste Messung erfolgt. Zunächst müssen die Zellen beider Linien wieder, wie bereits beschrieben, gespült, abtrypsinisiert und zentrifugiert werden. Anschließend erfolgt erneut die Konzentrationsbestimmung in der NEUBAUER-Zählkammer unter alleiniger Berücksichtigung der proliferationsfähigen vitalen Zellen. In Kenntnis der jeweiligen Zellkonzentrationen von CX-2 und DAN-G im 1-Milliliter-Ansatz erfolgt die Verdünnung der Suspensionen auf für das weitere Vorgehen günstige Konzentrationen. Im Falle des Ansatzes mit 5.000 Zellen pro Loch bedeutet dies eine Verdünnung auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter. Von dieser Suspension werden jeweils 50 µl in jedes Loch gegeben, was einer Zellzahl von 5.000 entspricht. Die Verdünnung für den zweiten Ansatz erfolgt auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter. Ein Volumen von 100 µl entspricht in diesem Fall einer Zellzahl von 1.000. Nach dem Ausplattieren werden alle Löcher mit Medium auf ein Volumen von jeweils 250 µl aufgefüllt.

An den im Plan vorgesehenen Tagen wird die Proliferation der betreffenden Zellen gestoppt, indem das Medium aus den Löchern mit niedrigem Sog abgesaugt wird. Im Anschluß werden die Zellen dreimal mit PBS mit Calcium und Magnesium (Gibco BRL) gespült und danach durch Fönen getrocknet.

Nachdem auch die Proliferation der Zellen des zwanzigsten Tages nach der beschriebenen Methode gestoppt worden ist, erfahren die Zellen in den Platten im weiteren Verlauf die Behandlung zur Vorbereitung auf die DNA-Färbung mit Pico Green und die abschließende Messung im UV-Photometer (Cytofluor): Zunächst folgt das vierundzwanzigstündige Andauen der Zellen mit 100 µl Papain (Sigma Steinheim) pro Loch in einer Verdünnung von 1:200 im Cysteinpuffer. Die Inkubation selbst findet bei 60° C im feuchten Milieu statt. Hieran schließt sich wieder die Markierung der nun frei vorliegenden Tumorzell-DNA durch die zehnmünütige Inkubation der Platten mit Pico Green (Molecular Probes Oregon) 1:100 in TRIS/EDTA [2x] in einer Menge von ebenfalls 100 µl pro Loch an. Danach erfolgt die Messung im UV-Photometer bei B/B 3 (ex=485 nm, em=520 nm).

2.2.6 Statistische Verfahren und Programme

Die statistischen Berechnungen in der hier vorgestellten Arbeit erfolgen computergestützt mit Hilfe des Programmes „BiAS – Biometrische Analyse von Stichproben“ für Windows 95 in der Version 6.0 (Dr. Hanns Ackermann, Frankfurt 1997). Die tabellarische und graphische Aufbereitung der Werte erfolgt mit Hilfe von Microsoft®-Excel. Im Rahmen der statistischen Auswertung der erhobenen Daten werden in allen Fällen zunächst die Basisgrößen Mittelwert, Varianz und Standardabweichung berechnet. In allen Fällen erfolgt weiterhin die Prüfung der Stichprobenwerte auf Normalverteilung mit Hilfe des F-Tests.

3. ERGEBNISSE

INHALT DES DRITTEN KAPITELS	
3.1 Vorversuche.....	Seite 31
3.1.1 Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer.....	Seite 31
3.1.2 pH-Wert-Bestimmungen.....	Seite 35
3.2 Hauptversuche.....	Seite 36
3.2.1 Nekrosefärbung mit Propidium-Iodid.....	Seite 36
3.2.2 Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green.....	Seite 38
3.3 Zusatzversuche.....	Seite 45
3.3.1 Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz.....	Seite 45
3.3.2 Plateaubestimmung.....	Seite 46

3.1 Vorversuche

3.1.1 Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer

Mit der im vorausgegangenen Teil beschriebenen Methode ist die Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer für beide Zelllinien leicht durchzuführen. Für jeden Tag, jede Druckgruppe und jede Zelllinie werden die Werte für die acht angesetzten Stichproben ausgezählt. Die Zählergebnisse werden als absolute Zellzahl in Millionen Zellen dokumentiert. Die statistische Auswertung schließt die obligaten Basisberechnungen (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung) sowie zur Signifikanzprüfung den F-Test, den Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Test, den Kruskal-Wallis-Test und den Dunn-Test mit alpha-Korrektur nach Holm ein. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 6 und 7 zusammengefaßt.

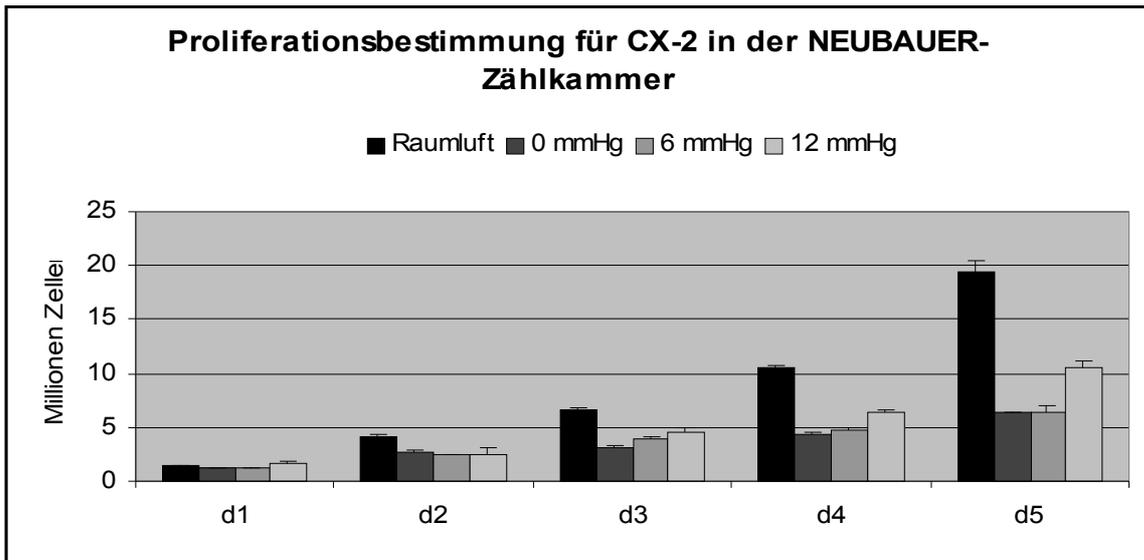


Abbildung 6: Proliferationsbestimmung für CX-2 in der NEUBAUER-Zählkammer

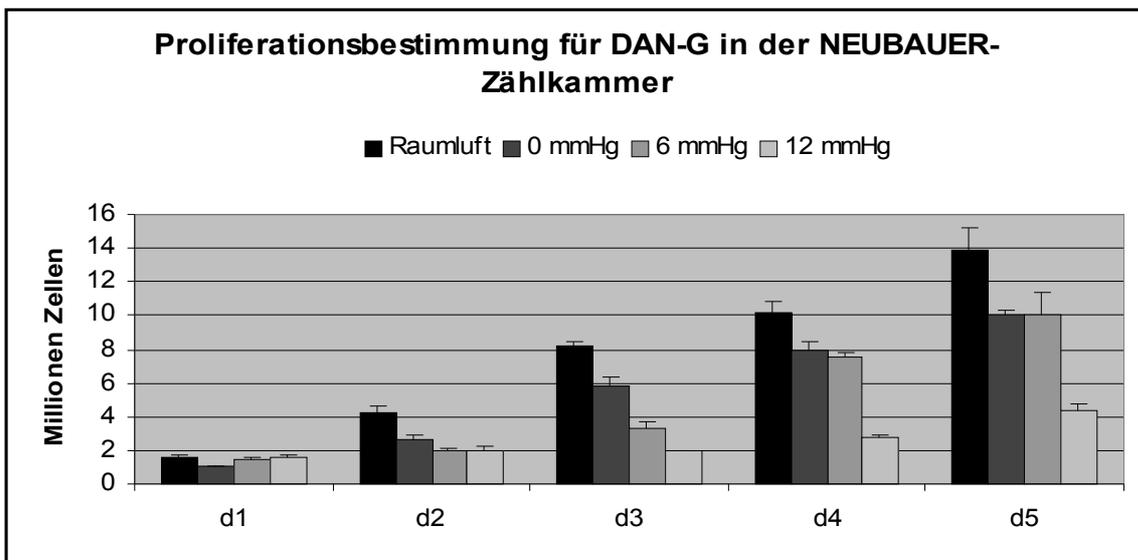


Abbildung 7: Proliferationsbestimmung für DAN-G in der NEUBAUER-Zählkammer

Betrachtet man sich die Entwicklung der Durchschnittswerte der Zellzahlen eines Tages in den drei verschiedenen Kohlendioxid-Gruppen von CX-2 und DAN-G, so kann zum einen festgestellt werden, daß bei beiden Zelllinien die Kontrollgruppen durchgehend die größten mittleren Zellzahlen aufweisen. Weiterhin fällt auf, daß im Fall von CX-2 von allen Gasgruppen in derjenigen der mit maximalem Druck behandelten Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum die größten Durchschnittswerte gefunden werden können. Die geringsten Werte für die mittleren Zellzahlen finden sich in der Gruppe der mit isobarem Kohlendioxid behandelten Zellen. Dazwischen liegt die 6-mmHg-Gruppe. Bei DAN-G verhält es sich genau umgekehrt. Die größten Durchschnittswerte finden sich hier in der isobaren Gruppe, die geringsten in der 12-mmHg-Gruppe. Ebenfalls dazwi-

schen liegen die Werte der Gruppe mittleren Drucks. Auf diese Unterschiede wird zu einem späteren Zeitpunkt nochmals eingegangen werden.

Mit Hilfe des Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Tests wird zunächst der Einzelvergleich der Stichprobenwerte der verschiedenen Druckgruppen eines jeden Tages und Zelltyps mit den für die entsprechenden Kontrollgruppen gewonnenen Werten durchgeführt. Im Falle des Colon-Adenokarzinoms CX-2 finden sich bereits ab dem zweiten Tag nach der CO₂-Behandlung signifikant höhere Zellzahlen in der Kontrollgruppe ($n_{k_0} = 2,76 \cdot 10^6$) im Vergleich zu denen in der jeweiligen Gasgruppe, was sich bis zum letzten Tag des Beobachtungszeitraumes nicht mehr ändert. Die Testwerte liegen hier in allen Fällen bei $p < 0,01$. Am ersten Tag nach der CO₂-Exposition sind die Ergebnisse dagegen noch uneinheitlich. So kann man bei Betrachtung der Werte beider Gruppen, deren Zellen mit hyperbarem Kohlendioxid behandelt worden sind, auch hier schon signifikant höhere Zellzahlen in der Kontrollgruppe finden ($n_{k_0} = 1,4 \cdot 10^6$). Die Werte liegen in beiden Fällen bei $p < 0,01$. Demgegenüber fördert der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit den isobar behandelten Zellen noch keine statistisch relevanten Unterschiede zutage. Der p-Wert aus dem u-Test liegt hier nur bei 0,1949.

Auch für die Zellen des Pankreaskarzinoms DAN-G liegt ein vergleichbares Datenmaterial vor: Ab dem zweiten Tag finden sich in den Kontrollgruppen signifikant höhere Zellzahlen als in den verschiedenen Gasgruppen mit p-Werten, die durchgehend kleiner als 0,01 sind. Auch hier bleiben diese Unterschiede bis zum letzten Beobachtungstag signifikant. Im Unterschied zu CX-2 sind jedoch die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Gasgruppen am ersten Tag nach Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid im Einzelvergleich in nur einem einzigen Fall signifikant, nämlich dem der Gruppe mit den isobar behandelten Zellen.

Es folgt der globale Gruppenvergleich der Stichprobenwerte der drei Kohlendioxidgruppen von CX-2 und DAN-G eines jeden Tages mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Der Kruskal-Wallis-Test liefert einen globalen p-Wert durch den Simultanvergleich aller drei Gasgruppen eines Tages und einer Zelllinie untereinander. Er macht keine detaillierte Aussage über spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Gasgruppen. Daher wird im Anschluß an den Kruskal-Wallis-Test der Dunn-Test durchgeführt, welcher die fehlenden Einzelvergleiche vornimmt und damit das vorherige Verfahren ergänzt.

Im Falle von CX-2 ist das globale p nach Kruskal-Wallis an allen fünf Tagen signifikant (am dritten Tag 0,03, ansonsten immer $< 0,01$). Auch im Falle des für die Zellen des Pankreaskarzinoms DAN-G durchgeführten Globaltests lassen sich entsprechende Aussagen machen. Die p-Werte liegen hier an allen Tagen unter dem 0,01-Niveau.

Betrachtet man nun für jede Zelllinie die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Zellzahlen der verschiedenen Tage in den einzelnen Druckgruppen, und stellt man weiterhin den Vergleich zwischen den einzelnen Stichprobenwerten einer Zelllinie in den drei Druckgruppen eines Tages mit Hilfe des Dunn-Tests an, so lassen sich zunächst für CX-2 folgende Beobachtungen machen: Am ersten Tag findet sich die größte mittlere Zellzahl in der Gruppe der mit Kohlendioxid unter einem Druck von 12 mmHg behandelten Zellen ($n_{12} = 1,63 \cdot 10^6$). Im Durchschnitt waren die geringsten Zahlen in den Flaschen der gegenüber einem Druck von 6 mmHg ausgesetzten Zellen auszuzählen ($n_6 = 1,14 \cdot 10^6$). Die Unterschiede zwischen allen möglichen Kombinationen werden vom Dunn-Test als signifikant ausgewiesen ($p < 0,05$).

Am zweiten Auswertungstag von CX-2 finden sich die meisten Zellen in den Flaschen der isobaren Gruppe ($n_0 = 2,76 \cdot 10^6$), gefolgt von denen der 12-mmHg- und der 6-mmHg-Gruppen ($n_{12} = 2,56 \cdot 10^6$ und $n_6 = 2,41 \cdot 10^6$). Jedoch können die Unterschiede in den Zellzahlen nur für den Vergleich zwischen der isobaren und der 6-mmHg-Gruppe als signifikant bezeichnet werden ($p < 0,05$). Am dritten postexpositionellen Tag kann in der Gruppe des höchsten Druckes die größte Zellzahl ausgezählt werden ($n_{12} = 4,50 \cdot 10^6$), gefolgt von der Gruppe des mittleren ($n_6 = 3,86 \cdot 10^6$) und des isobaren Drucks

($n_0 = 3,07 \cdot 10^6$). Gegenüber der Zellzahl aus der letztgenannten Gruppe erweisen sich diejenigen aus den beiden anderen Gruppen als signifikant verschieden. Das Zahlenverhältnis am vierten Tag ist das gleiche wie am Tag zuvor. Signifikante Unterschiede ergeben sich im Vergleich der Stichprobenwerte aus der 12-mmHg-Gruppe mit denen der anderen beiden Gruppen, nicht jedoch zwischen der Gruppe isobaren Kohlendioxids und der der mit 6 mmHg behandelten Zellen. Auch am fünften Tag ist die 12-mmHg-Gruppe diejenige mit der größten Zellzahl ($n_{12} = 10,59 \cdot 10^6$). Annähernd gleiche Zahlen finden sich in den beiden anderen Gruppen ($n_6 = 6,32 \cdot 10^6$ und $n_0 = 6,40 \cdot 10^6$). Entsprechend fehlt es an signifikanten Unterschieden zwischen den Zahlen der Gruppe mit isobarer CO₂-Einwirkung und der Gruppe mit den mit Kohlendioxid unter einem Druck von 6 mmHg behandelten Zellen ($p = 0,72$), wohingegen sich jedoch die Zellzahlen dieser beiden Gruppen signifikant von denen der Gruppe maximalen Druckes unterscheiden ($p < 0,01$ in beiden Fällen).

Für den Vergleich der mittleren Zellzahlen und für die Einzelvergleiche zwischen den Tageswerten der drei Kohlendioxidgruppen von DAN-G mit Hilfe des Dunn-Tests lassen sich die folgenden Aussagen machen: Am ersten Tag ist die 12-mmHg-Gruppe die mit der größten mittleren Zellzahl ($n_{12} = 1,65 \cdot 10^6$), gefolgt von den Gruppen mit jeweils niedrigerem Druck. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den Zellzahlen der isobaren Gruppe einerseits und den Zahlen der beiden anderen Gruppen andererseits. Am folgenden Tag sind die Zahlenverhältnisse spiegelbildlich zum Vortag mit der größten mittleren Zellzahl in der Gruppe isobaren Drucks ($n_0 = 2,68 \cdot 10^6$), gefolgt von den Gruppen mit dem jeweils nächsthöheren Druck. Die Signifikanzen für die Unterschiede zwischen den einzelnen Druckgruppen sind verteilt wie am Vortag.

Was für die mittleren Zellzahlen des zweiten postexpositionellen Tages von DAN-G gesagt wurde, gilt auch für die letzten drei Tage des Beobachtungszeitraumes. Es finden sich also die größten Durchschnittswerte in den Gruppen der mit isobarem Kohlendioxid behandelten Zellen, gefolgt von den Mittelwerten der 6-mmHg-Gruppe und denen der Gruppe, deren Zellen dem maximalen Druck von zwölf Millimeter Quecksilbersäule ausgesetzt worden sind. Die Frage nach der statistischen Relevanz dieser Unterschiede hilft wiederum der Dunn-Test mittels des Vergleichs der einzelnen Stichprobenwerte zu beantworten. Demnach liegen die p-Werte am dritten Tag für alle drei möglichen Kohlendioxidgruppen-Vergleiche unter dem fünf-Prozent-Niveau. An den letzten beiden Tagen erweisen sich die Unterschiede zwischen der 12-mmHg-Gruppe einerseits und der 6-mmHg-Gruppe sowie der isobaren Gruppe andererseits als signifikant ($p < 0,05$), nicht jedoch die Unterschiede zwischen den beiden letztgenannten Gruppen ($p = 0,23$ am vierten Tag und $p = 0,89$ am fünften Tag).

Zur statistischen Auswertung der eingangs gemachten Feststellung des diametral entgegengesetzten Verhaltens der Zellen von CX-2 und DAN-G gegenüber Kohlendioxid und Druck wird zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Testverfahren der Wilcoxon-matched-pairs-Test angewandt. Dieser testet die an einem Tag für einen gegebenen Druck gewonnenen Ergebnisse von CX-2 einerseits und DAN-G andererseits gegeneinander und arbeitet somit zellgruppenübergreifend.

Der Vergleich der unter isobarem Druck gewonnenen Tageswerte der drei Kohlendioxid-Gruppen von CX-2 und DAN-G untereinander zeigt mit Werten von $p < 0,01$ signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen für den ersten ebenso wie für den dritten, vierten und fünften Tag auf. Im Falle der 6-mmHg-Gruppen von CX-2 und DAN-G sind die Unterschiede an allen Tagen statistisch bedeutsam. Demgegenüber kann bei den Gruppen des größten Drucks erst ab dem dritten Tag von signifikanten Unterschieden zwischen den Zellzahlen des Colon- und des Pankreaskarzinoms gesprochen werden.

3.1.2 pH-Wert-Bestimmungen

Der mittlere pH-Wert des Kontrollmediums beträgt nach vier Stunden Raumluft 7,18. Der kleinste gemessene Einzelwert ist 7,076, der größte 7,322. Die Werte des Mediums der drei Kohlendioxidgruppen unterscheiden sich hiervon zum Teil deutlich. So beträgt der mittlere pH-Wert der isobaren Gruppe 6,474 (Minimum: 6,441; Maximum: 6,521). Der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration im Medium der 6-mmHg-Gruppe liegt bei 6,341 (Minimum: 6,326; Maximum: 6,375). Für die Gruppe des höchsten Drucks ergibt sich ein Mittelwert von 6,314. Das Minimum der Einzelwerte liegt bei 6,305, das Maximum bei 6,339.

Die Unterschiede zwischen den Werten der drei Kohlendioxidgruppen einerseits und denen der Kontrollgruppe andererseits erweisen sich im Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Test in allen Fällen als eindeutig ($p < 0,01$ für alle drei Vergleiche). Auch der globale Vergleich der drei Kohlendioxidgruppen untereinander mittels des Kruskal-Wallis-Tests weist die gruppeninternen Unterschiede als signifikant aus ($p < 0,01$). Im Einzelvergleich der drei CO₂-Gruppen untereinander mit Hilfe des Dunn-Tests wird deutlich, daß nur der Unterschied zwischen der isobaren Gruppe und der Gruppe des mit maximalem Druck behandelten Mediums statistisch relevant ist ($p < 0,01$). Nicht signifikant dagegen sind die Unterschiede zwischen der 6-mmHg-Gruppe einerseits und der isobaren und der 12-mmHg-Gruppe andererseits ($p = 0,09$ bzw. $p = 0,18$).

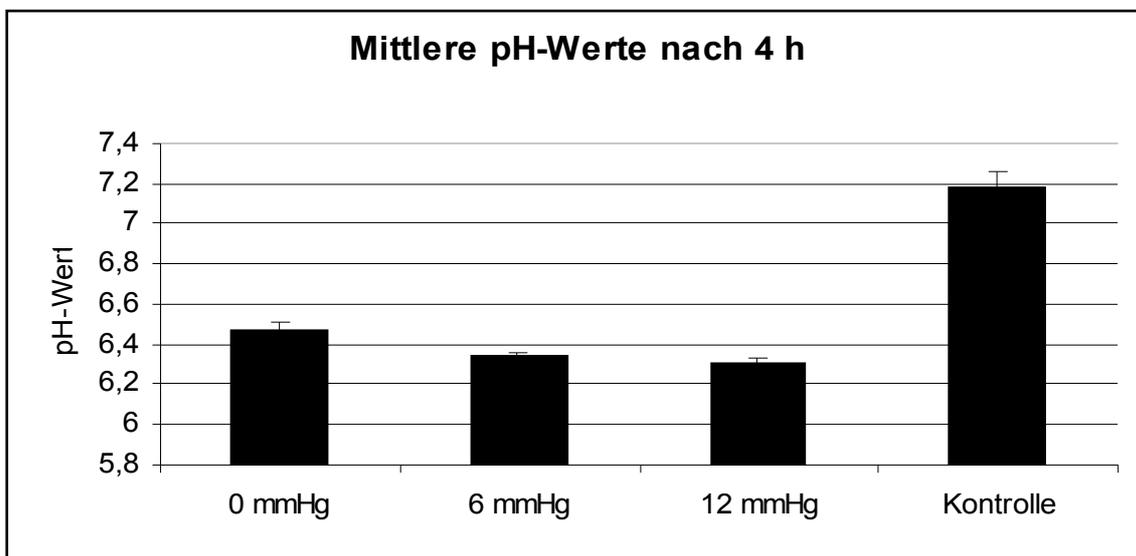


Abbildung 8: Azidometrie des Nährmediums nach vierstündiger Kohlendioxid-Exposition

3.2 Hauptversuche

3.2.1 Nekrosefärbung mit Propidium-Iodid

Das Experiment untersucht, inwieweit dem Kohlendioxid und dessen Druck zytotoxische Effekte zugeschrieben werden können. Es werden hierzu Gruppen mit Zellen verglichen, die zum einen entsprechend der üblichen Vorgehensweise mit Kohlendioxid unter den drei verschiedenen Drücken behandelt worden sind. Zum anderen liegt als Negativkontrolle eine Gruppe mit unbehandelten Zellen sowie als Positivkontrolle eine Gruppe mit zuvor mit Formalin abgetöteten Zellen vor. Die nekrotischen Zellen werden mit Propidium-Iodid (Sigma München) markiert und anschließend im Durchflußzytometer (FacScan, Becton Dickinson) gemessen. Diese Untersuchung der Zellen erfolgt unmittelbar im Anschluß an die vierstündige Behandlung mit Kohlendioxid. An statistischen Basisgrößen werden Mittelwert, Varianz und Standardabweichung berechnet. Ferner finden der F-Test und der Welch-t-Test als Signifikanzprüfungen für die Einzelvergleiche und der Kruskal-Wallis-Test und der Dunn-Test mit der Alpha-Korrektur nach Holm für die Gruppenvergleiche Anwendung.

Die zuerst durchgeführten Referenzmessungen mit den durch Formalin abgetöteten Zellen von CX-2 und DAN-G ergeben erwartungsgemäß Nekrosenraten von nahezu einhundert Prozent (in beiden Fällen durchschnittlich 99,87% mit einer Standardabweichung von 0,04, siehe *Abbildung 9*).

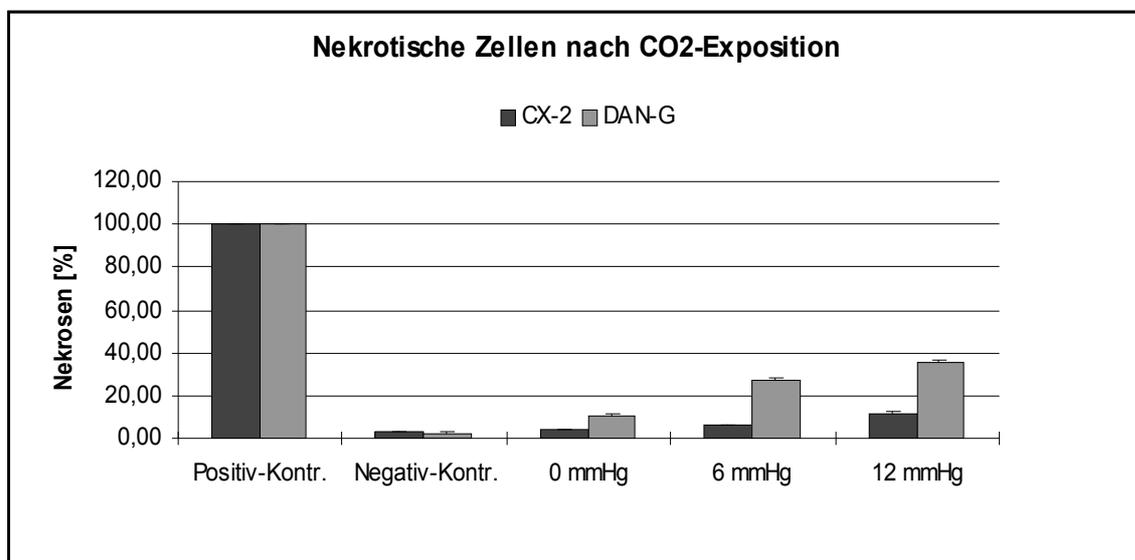


Abbildung 9: Anteile nekrotischer Zellen von CX-2 und DAN-G nach vierstündiger CO₂-Exposition

Betrachtet man die im nächsten Schritt gewonnenen Ergebnisse für das Colon-Adenokarzinom CX-2, so finden sich mit zunehmendem Druck des Kohlendioxids auch ansteigende Zahlen an nekrotischen Zellen in den Gruppen der exponierten Zellen (*Tabelle 1*).

Vergleicht man die Stichprobenwerte der drei Kohlendioxidgruppen mit den Werten der Kontrollgruppe mit Hilfe des Welch-t-Tests, so lassen sich in allen drei Fällen statistisch relevante Unterschiede mit Werten von $p < 0,01$ feststellen.

CX-2	PosKontr	0 mmHg	NegKontr	6 mmHg	NegKontr	12 mmHg	NegKontr
Wert1	99,90	4,70	3,59	4,81	3,59	10,75	3,59
Wert2	99,80	3,39	3,11	5,99	3,11	11,48	3,11
Wert3	99,80	3,79	2,87	6,23	2,87	12,21	2,87
Wert4	99,90	4,27	2,99	6,43	2,99	11,86	2,99
Wert5	99,90	4,06	3,39	5,87	3,39	12,30	3,39
Wert6	99,90	3,67	3,43	6,10	3,43	11,77	3,43
Mittelwert	99,87	3,98	3,23	5,91	3,23	11,73	3,23
Varianz	0,0022	0,1815	0,0661	0,2711	0,0661	0,2661	0,0661
StdAbwg.	0,0471	0,4260	0,2571	0,5206	0,2571	0,5158	0,2571
F-Test		0,2919		0,1476		0,1527	
Welchs p		< 0,01		< 0,01		< 0,01	

Tabelle 1: Ergebnisse der Nekrosefärbungen mit Propidiumiodid für CX-2 (in Prozent)

Im Falle der beiden Ansätze von CX-2 ergeben sich damit die folgenden absoluten Zellzahlen für den Zeitpunkt unmittelbar nach der Behandlung mit Kohlendioxid:

Ausgangszahl	Pos.-Kontr.	Neg.-Kontr.	0 mmHg	6 mmHg	12 mmHg
5000	5	4838	4798	4706	4414
1000	1	968	960	941	883

Tabelle 2: Zellzahlen für CX-2 unmittelbar nach CO₂-Exposition

Die gleiche Aussage kann auch für den Vergleich der für die mit Kohlendioxid behandelten Zellen des Pankreaskarzinoms DAN-G gemessenen Werte mit denen ihrer Kontrollgruppe gemacht werden (Tabelle 2).

DAN-G	PosKontr	0 mmHg	NegKontr	6 mmHg	NegKontr	12 mmHg	NegKontr
Wert1	99,90	10,22	2,53	28,65	2,53	34,19	2,53
Wert2	99,90	9,98	2,77	24,33	2,77	35,27	2,77
Wert3	99,80	11,99	2,64	23,97	2,64	33,24	2,64
Wert4	99,90	10,03	3,01	26,64	3,01	36,94	3,01
Wert5	99,90	11,21	2,08	27,47	2,08	35,89	2,08
Wert6	99,80	10,70	2,34	25,99	2,34	37,76	2,34
Mittelwert	99,87	10,69	2,56	26,62	2,56	35,27	2,56
Varianz	0,0022	0,5201	0,0887	2,0969	0,0887	2,3743	0,0887
StdAbwg.	0,0471	0,7212	0,2979	1,4480	0,2979	1,5408	0,2979
F-Test		0,0748		0,0034		0,0025	
Welchs p		< 0,01		0,01		< 0,01	

Tabelle 3: Ergebnisse der Nekrosefärbungen mit Propidiumiodid für DAN-G (in Prozent)

Im Falle der beiden Ansätze von DAN-G ergeben sich damit die folgenden absoluten Zellzahlen für den Zeitpunkt unmittelbar nach der Behandlung mit Kohlendioxid:

Ausgangszahl	Pos.-Kontr.	Neg.-Kontr.	0 mmHg	6 mmHg	12 mmHg
5000	7	4872	4466	3691	3245
1000	1	974	893	738	648

Table 4: Zellzahlen für DAN-G-2 unmittelbar nach CO₂-Exposition

Für den gasgruppeninternen Vergleich der für CX-2 erhaltenen Stichprobenwerte kommt der Globaltest nach Kruskal-Wallis zur Anwendung. Dieser weist ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen aus ($p < 0,01$ für alle möglichen Kombinationen). Die Einzelvergleiche mittels des Dunn-Tests weisen auch den spezifischen Unterschied zwischen der isobaren Gruppe und der Gruppe des maximalen Drucks von zwölf Millimetern Quecksilbersäule als statistisch aussagekräftig aus ($p < 0,01$), nicht jedoch die Unterschiede aus den verbleibenden Kombinationsmöglichkeiten zwischen der sechs-Millimeter-Gruppe einerseits und der null- und zwölf-Millimeter-Gruppe andererseits ($p = 0,1$ in beiden Fällen). Entsprechendes gilt ebenfalls wieder für die Auswertungen der Ergebnisse für DAN-G.

Anhand der vorliegenden Daten kann damit davon ausgegangen werden, daß der Einfluß von Kohlendioxid alleine ebenso wie der Einfluß verschiedener Drücke dieses Gases quantifizierbare und mit statistischen Methoden als relevant nachweisbare zellschädigende Auswirkungen auf die Zellen sowohl des Colon-Adenokarzinoms CX-2 als auch des Pankreaskarzinoms DAN-G haben. Diese zytotoxischen Effekte müssen bei der Auswertung der im Rahmen der Proliferationsmessungen gewonnenen Ergebnisse im Auge behalten werden.

3.2.2 Quantitative DNA-Bestimmung mit PICO-Green

Die Experimente zur quantitativen DNA-Bestimmung mit Pico Green stellen die umfangreichste aller hier vorzustellenden Versuchsreihen dar. Sie bedeuten weiterhin eine methodische Verbesserung und eine zeitliche Ausweitung der im Rahmen der Vorversuche vorgestellten Proliferationsmessung durch die Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer von fünf auf fünfzehn Tage. Durch die Erhöhung der Zahl der Stichproben pro Ansatz soll außerdem die Aussagekraft der statistischen Resultate erhöht werden.

Pro Tag, Versuchsgruppe und Zelllinie werden zwanzig dimensionslose Stichprobenwerte erhalten. Diese geben die Intensität der Fluoreszenz der durch das Pico Green markierten Tumorzell-DNA an. Die Höhe der Fluoreszenz ist dabei in stets direktem proportionalem Verhältnis von der wirklichen DNA-Menge abhängig.

Zunächst werden wieder die Einzelvergleiche zwischen den für das Colonkarzinom CX-2 gewonnenen Ergebnisse aus den CO₂-Sitzungen mit den Werten der unbehandelten Kontrollgruppen-Zellen mit Hilfe des Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Tests durchgeführt. Diese ergeben bereits am ersten Tag nach der Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid signifikant höhere DNA-Fluoreszenzen im Falle der Kontrollgruppe mit p-Werten, die für alle drei Gruppen (0, 6, 12 mmHg) deutlich unter dem Ein-Prozent-Niveau liegen. Dasselbe kann auch für die Tage zwei und drei nach der Behandlung mit Kohlendioxid

gelten. Am vierten postexpositionellen Tag läßt die isobare Gruppe mit einem Wert von $p = 0,79$ die bis dahin gegebene Signifikanz allerdings vermissen (*Abbildung 10*). Weiterhin statistisch eindeutig höhere DNA-Meßwerte in der Kontrollgruppe finden sich jedoch im Vergleich mit den beiden Gruppen mit den gegenüber hyperbarem Kohlendioxid ausgesetzten Zellen ($p < 0,05$ in beiden Fällen).

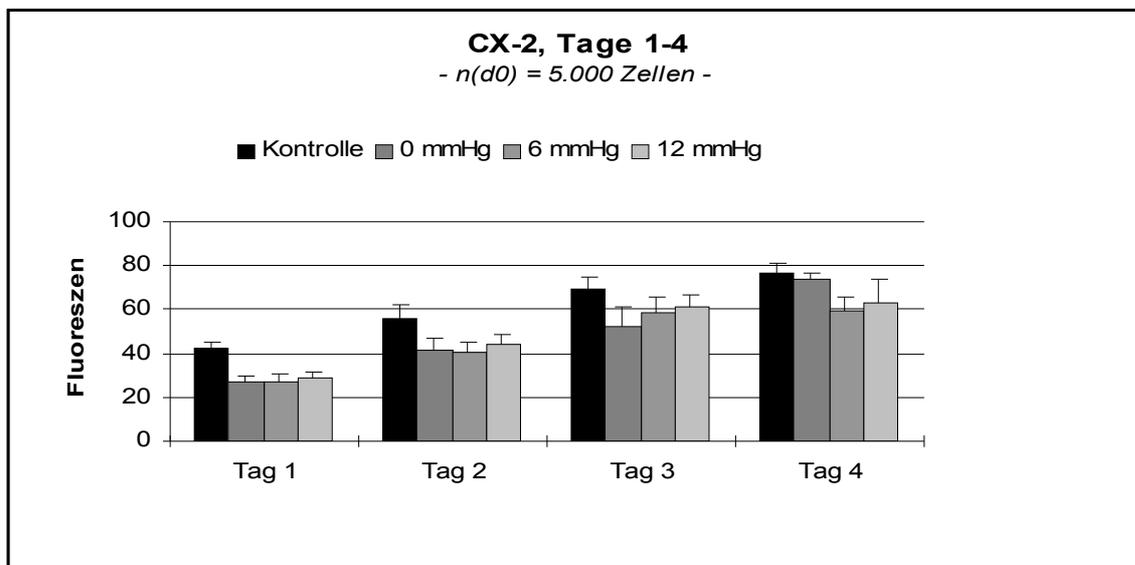


Abbildung 10: Proliferation von CX-2 für die Tage 1-4 nach Kohlendioxid-Eposition

Die Tage fünf und sieben sind dagegen wieder einheitlich. Hier sind in allen drei Fällen die Fluoreszenzwerte in der Kontrollgruppe gegenüber denen der Kohlendioxidgruppen signifikant erniedrigt. Die p-Werte liegen hier überall deutlich unter dem Niveau von 0,01. Am neunten Tag kehrt sich das Verhältnis zwischen der Fluoreszenz der Kontrollzell-DNA und der der DNA aus der isobaren Gruppe wieder um, und die Werte in der unbehandelten Gruppe sind wieder gegenüber denen der null-mmHg-Gruppe signifikant erhöht ($p = 0,01$). Dies ändert sich nicht mehr bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Im Falle der beiden hyperbaren Gruppen (d. h. unter 6 und 12 mmHg) sind am neunten Tag die Zellzahlen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, dies jedoch nicht mehr signifikant ($p = 0,16$ bzw. $p = 0,26$). Ab dem dreizehnten Tag finden sich in den beiden hyperbaren Kohlendioxid-Gruppen ebenso wie in der isobaren Gruppe signifikant weniger Zellen als in der Kontrollgruppe.

Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß am elften Tag im Falle der Gruppe des maximalen Druckes die für diese gemessenen Fluoreszenzwerte noch immer über denen der Kontrollgruppe liegen. (*Abbildung 11*). Die mittels des u-Tests erhaltenen Resultate zeigen für diese Unterschiede in allen verbleibenden Fällen eine Signifikanz mit p-Werten von durchgehend weniger als einem Prozent.

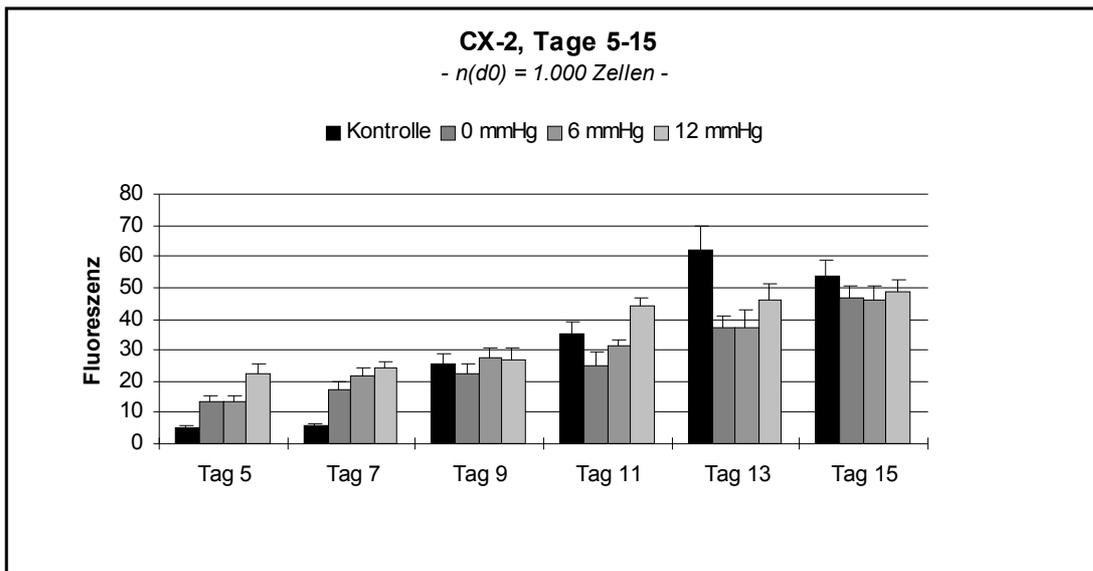


Abbildung 11: Proliferation von CX-2 für die Tage 5-15 nach Kohlendioxid-Exposition

Um des weiteren die Ergebnisse der drei verschiedenen Druckgruppen untereinander zu vergleichen, werden als Globaltest wieder der Kruskal-Wallis-Test und für den spezifischen Einzelvergleich der Druckgruppen miteinander der Dunn-Test angewandt. Am ersten Tag findet sich die stärkste Fluoreszenz in der Gruppe der mit dem höchsten Druck behandelten Zellen (mittlerer Fluoreszenzwert $F_{12} = 29,05$), die niedrigste in der Gruppe mittleren Drucks ($F_6 = 26,8$). Diese Unterschiede erweisen sich jedoch weder im Globaltest noch im Einzelvergleich als signifikant: Der Wert des Kruskal-Wallis-p beträgt 0,08, das p im Dunn-Test in allen drei möglichen Kombinationen der Kohlendioxidwerte 0,1. Dasselbe gilt für den Vergleich dieser beiden Gruppen mit der der mit dem mittleren Druck von 6 mmHg behandelten Zellen.

Die Rangliste der mittleren Fluoreszenzen des zweiten Tages ist identisch mit der des Vortages (maximal: $F_{12} = 43,8$; minimal: $F_6 = 40,05$). Der Globaltest fällt mit $p = 0,05$ gerade nicht mehr signifikant aus. Jedoch ergibt der spezifische Vergleich zwischen den beiden hyperbaren Gruppen mit einem Dunn-p von 0,04 dennoch eine statistische Relevanz für diesen Einzelfall. Die anderen beiden Signifikanzprüfungen fallen mit Werten von $p > 0,2$ negativ aus.

Für den dritten Tag ist die maximale mittlere Fluoreszenz wieder im Falle der 12-mmHg-Gruppe zu finden ($F_{12} = 60,85$), die minimale in der isobaren Gruppe ($F_6 = 52,05$). Der globale Signifikanztest nach Kruskal-Wallis fällt mit $p < 0,05$ positiv aus, ebenso der spezifische Vergleich der beiden Gruppen mit maximalem und minimalem Druck miteinander ($p < 0,05$). Für den Unterschied zwischen der isobaren und der sechs-Millimeter-Gruppe weist der Dunn-Test mit $p = 0,051$ ein gerade nicht mehr signifikantes Ergebnis aus.

Am vierten postexpositionellen Tag kann die maximale mittlere Fluoreszenz in der isobaren Gruppe gemessen werden ($F_{iso} = 73,7$), der kleinste der drei Werte ist in der Gruppe mittleren Drucks zu finden ($F_6 = 58,15$). Der Kruskal-Wallis-Test gibt einen globalen Signifikanzwert von $p < 0,01$ an. Im spezifischen Vergleich liegt der p-Wert nach Dunn für die Vergleiche der Werte der hyperbaren Gruppen mit denen der isobar behandelten Zellen unterhalb des 0,01-Niveaus. Die Signifikanzprüfung zwischen den beiden hyperbaren Gruppen fällt mit $p = 0,59$ negativ aus.

Ab dem nun folgenden Tag des Beobachtungszeitraumes ist von vornherein mit niedrigeren Fluoreszenzwerten zu rechnen, da nun aus den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Gründen die Zahl der in jedes Loch eingesetzten Zellen von ursprünglich 5.000 auf 1.000 reduziert worden ist.

So entspricht am fünften Tag der maximalen mittleren Fluoreszenz, die in der Gruppe des maximalen Drucks zu finden ist, ein Wert von $F_{12} = 24,5$. Der kleinste Wert kann mit $F_{\text{iso}} = 13,25$ in der isobaren Gruppe gefunden werden. Der unspezifische Vergleich mittels des Kruskal-Wallis-Tests weist die Unterschiede zwischen den Gruppen global als signifikant aus ($p < 0,01$). Ebenso erklärt der Dunn-Test die spezifischen Unterschiede zwischen der 12-mmHg-Gruppe einerseits und den anderen beiden Gruppen andererseits als statistisch relevant ($p < 0,01$ in beiden Fällen), nicht jedoch den zwischen den beiden Gruppen mit den mit hyperbarem Kohlendioxid behandelten Zellen ($p = 0,66$).

Die Rangliste der mittleren Fluoreszenzen des siebten Tages nach CO_2 -Behandlung entspricht der des sechsten. Auch der CO_2 -Gruppen-interne Globaltest nach Kruskal-Wallis und die drei individuellen Signifikanzprüfungen nach Dunn führen zu denselben Aussagen wie am Vortag.

Für den neunten Tag der Messungen ist die Situation jedoch wieder eine andere. So kann die maximale durchschnittliche Fluoreszenz nun in der Gruppe der mit unter einem Druck von 6 mmHg stehenden Kohlendioxid behandelten Zellen gefunden werden ($F_6 = 27,4$). Das Minimum liegt bei $F_{\text{min}} = 22,6$ im Falle der isobaren Gruppe. Hinsichtlich der Ergebnisse, die der Kruskal-Wallis- und der Dunn-Test liefern, führt diese gegenüber den beiden Vortagen verschiedene Rangfolge jedoch zu keiner Veränderung der Testergebnisse. So liegt der Wert des globalen p wieder unter dem Ein-Prozent-Niveau, ebenso wie die Werte des Dunn- p für den Vergleich zwischen der isobaren Gruppe einerseits und den beiden hyperbaren Gruppen andererseits.

Die maximale mittlere Fluoreszenz der Tumorzell-DNA am elften Tag ist in der 12-mmHg-Gruppe auszumachen ($F_{12} = 44,7$), das Minimum findet sich in der Gruppe des Ansatzes mit isobarem CO_2 ($F_{\text{iso}} = 25,2$). Hinsichtlich der Ergebnisse der Signifikanzprüfungen ist dieser Tag der einzige im Beobachtungszeitraum von CX-2, an dem sowohl der Kruskal-Wallis-Test als auch der Dunn-Test in allen drei Vergleichsmöglichkeiten mit p -Werten, die durchgehend unterhalb des Ein-Prozent-Niveaus liegen, deutlich signifikant ausfallen.

Der dreizehnte und damit vorletzte Tag der quantitativen DNA-Bestimmung für CX-2 bietet dieselbe Verteilung des Maximums und Minimums der durchschnittlichen DNA-Fluoreszenz wie der Vortag ($F_{\text{max}} = 45,8$ bei 12 mmHg, $F_{\text{min}} = 37,0$ bei 0 mmHg). Der Globalvergleich fällt mit $p < 0,01$ signifikant aus, ebenso der spezifische Vergleich zwischen den Stichprobenwerten der 12-mmHg-Gruppe einerseits und den übrigen beiden Gruppen andererseits.

Der fünfzehnte und letzte Tag zeigt nochmals eine veränderte Rangfolge der mittleren Extremwerte der Fluoreszenzen. Der größte Mittelwert findet sich wiederum in der 12-mmHg-Gruppe ($F_{12} = 48,85$), der niedrigste nun aber in der Gruppe der mit Kohlendioxid unter einem Druck von sechs Millimeter Quecksilbersäule behandelten Zellen ($F_6 = 46,35$). Weder der Globaltest nach Kruskal-Wallis noch die spezifischen Signifikanzprüfungen nach Dunn weisen diese Unterschiede jedoch als statistisch relevant aus.

An dieser Stelle ist nochmals hervorzuheben, daß es, nachdem die Zellen des Colon-Adenokarzinoms CX-2 Kohlendioxid unter den drei verschiedenen Drücken ausgesetzt gewesen sind, ab dem fünften Tag zu einem Umschlagen des Fluoreszenzverhältnisses zwischen den Kontrollwerten und den Kohlendioxidgruppenwerten des jeweiligen Tages kommt. Dies äußert sich darin, daß nun die Fluoreszenz der DNA der mit kohlendioxid behandelten Zellen größer ist als die der DNA der unbehandelten Zellen. Im Falle der isobar behandelten Zellen hält dieses Verhältnis noch weitere 48 Stunden bis zum siebten Tag an, um sich am neunten Tag erneut umzukehren. Für die 6-mmHg-Gruppe ist die

beschriebene Beobachtung dagegen noch zwei weitere Tage zu machen. Im Falle der Gruppe des maximalen Druckes von 12 mmHg hält dieser Zustand nochmals zwei weitere Tage an, bevor dann am dreizehnten Tag auch hier die Fluoreszenz in der Kontrollgruppe wieder größer ist als die in der Kohlendioxidgruppe. Es scheint damit eine Druckabhängigkeit dieser ab dem fünften postexpositionellen Tag gegenüber der Kontrollgruppe passager erhöhten Fluoreszenzen und damit auch Zellzahlen von CX-2 vorzuliegen.

Die gerade für die Zellen des Colon-Adenokarzinoms CX-2 vorgestellte Vorgehensweise der statistischen Analyse der erhobenen Daten findet nun auch für das Pankreaskarzinom DAN-G Anwendung.

Zunächst werden also auch hier die jeweils zwanzig Fluoreszenz-Tageswerte der drei Kohlendioxidgruppen mit den Stichprobenwerten der Kontrollgruppe im einzelnen miteinander verglichen. Das statistische Instrumentarium hierzu liefert wieder der Whitney-Mann-Wilcoxon-u-Test.

Im Falle von DAN-G finden sich bereits an den ersten beiden Tagen nach der Behandlung der Zellen mit Kohlendioxid statistisch relevante Unterschiede zwischen den Fluoreszenzwerten der drei Gasgruppen gegenüber denen der Kontrolle ($p < 0,01$ in allen Fällen). Die Fluoreszenzwerte der Kontrollgruppe sind hierbei größer als die der mit Kohlendioxid behandelten Zellen (*Abbildung 12*). Diese Signifikanz bleibt für den Vergleich der isobaren und der 6-mmHg-Gruppe einerseits mit den Kontrollgruppenwerten andererseits bis hin zum dritten Tag bestehen, ebenfalls mit höherer Fluoreszenz im Falle der unbehandelten Zellen ($p < 0,01$ am zweiten und $p < 0,05$ am dritten Tag). Auch am vierten Tag finden sich noch höhere Fluoreszenzen in der Kontrollgruppe. Die Differenz ist im Falle der mit 6 mmHg behandelten Zellen jedoch nur noch sehr grenzwertig signifikant ($p = 0,49$). Im Falle des Vergleichs zwischen Kontrolle und isobarer Gruppe finden sich zwar ebenfalls noch höhere Fluoreszenzwerte im Falle der unbehandelten Zellen; jedoch sind dort die Unterschiede so gering, daß hier nicht mehr von einer statistisch relevanten Differenz gesprochen werden kann ($p = 0,383$).

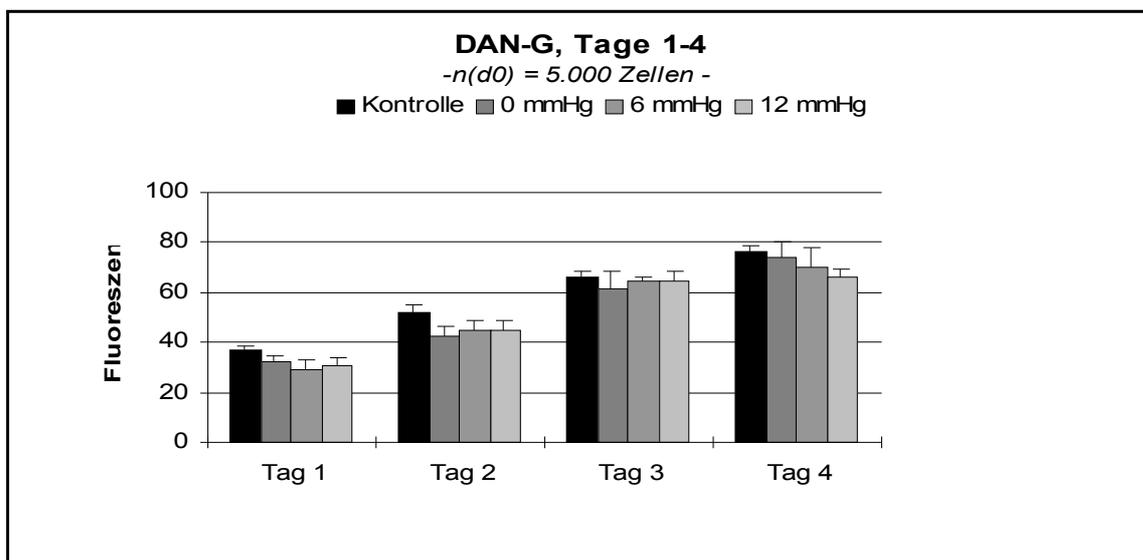


Abbildung 12: Proliferation von DAN-G für die Tage 1-4 nach Kohlendioxid-Exposition

Vom fünften bis zum neunten Tag können nun für alle drei Einzelvergleiche signifikant höhere Fluoreszenzwerte in den Kohlendioxid-Gruppen gefunden werden (p in allen Fällen $< 0,01$). Am elften Tag dagegen sind die Ergebnisse weniger einheitlich. So zeigt sich im Falle des Vergleichs zwischen den Gruppen der mit isobarem und der unter einem Druck von 12 mmHg stehenden Kohlendioxid behandelten Zellen einerseits und der Kontrollgruppe andererseits ebenfalls eine signifikant stärkere Fluoreszenz der DNA der mit Kohlendioxid behandelten Tumorzellen. Allerdings unterscheidet sich nur die 12-mmHg-Gruppe deutlich von der Kontrolle ($p < 0,01$); die Unterschiede zwischen der isobaren Gruppe und der Kontrolle sind dagegen nur mäßig signifikant ($p = 0,04$). In der 6-mmHg-Gruppe findet sich am elften Tag eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Fluoreszenz. Dies ist jedoch ohne statistische Relevanz ($p = 0,231$).

An den letzten beiden Tagen des Beobachtungszeitraumes übersteigen nun wieder die Fluoreszenzen in den Kohlendioxidgruppen die der DNA der Kontrollzellen (*Abbildung 13*). Es ist jedoch festzustellen, daß diese Unterschiede im Falle der beiden hyperbaren Gruppen nicht signifikant sind (p für 6 mmHg = 0,173; p für 12 mmHg = 0,085). Lediglich beim Vergleich zwischen den Werten der isobaren Gruppe mit denen der Kontrolle kann von einem statistisch relevanten Unterschied gesprochen werden ($p = 0,005$). Erst am fünfzehnten Tag sind die genannten Unterschiede wieder in allen drei Fällen deutlich signifikant (jedes $p < 0,01$).

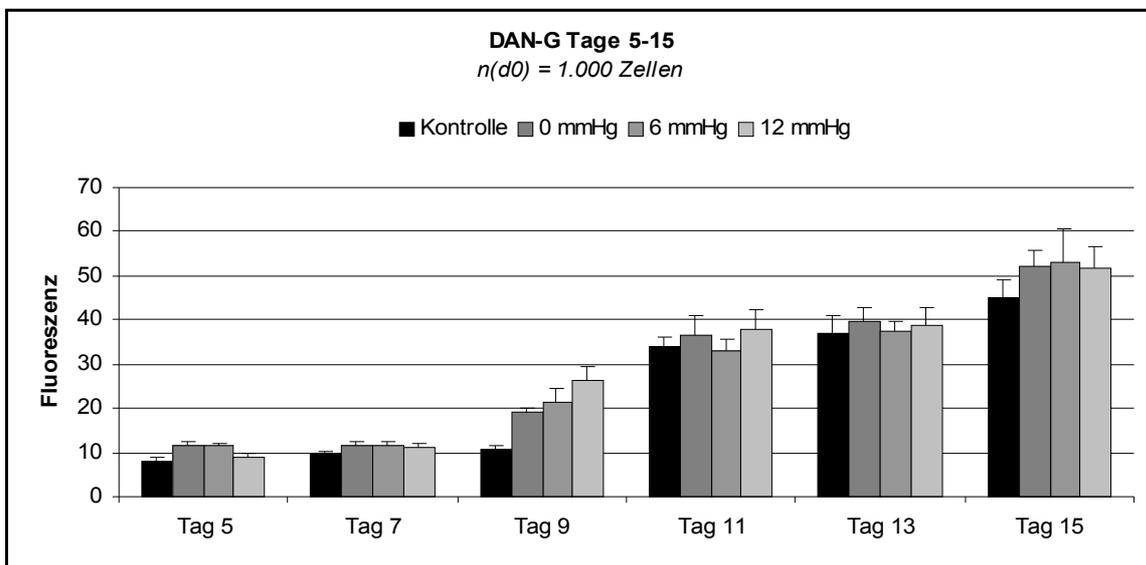


Abbildung 13: Proliferation von DAN-G für die Tage 5-15 nach Kohlendioxid-Exposition

Im folgenden kommen wieder der gruppenübergreifende Globaltest nach Kruskal-Wallis sowie jeweils im Anschluß die Kohlendioxid-Gruppen-spezifischen Einzelvergleiche mit Hilfe des Dunn-Tests zur Anwendung.

Am ersten Tag kann die stärkste Fluoreszenz in der Gruppe der mit isobarem Kohlendioxid behandelten Zellen gefunden werden ($F_{iso} = 32,45$), gefolgt von den Zellen der 12-

mmHg-Gruppe ($F_{12} = 31,05$) und denen der 6-mmHg-Gruppe ($F_6 = 29,2$). Der Globaltest weist diese Unterschiede als signifikant aus ($p = 0,014$). Im Einzelvergleich mittels des Dunn-Tests zeigt sich, daß nur die Differenzen zwischen den Werten der isobaren und denen der 12-mmHg-Gruppe als signifikant angesehen werden können ($p = 0,11$), nicht dagegen die Differenzen, die sich aus den übrigen Vergleichen ergeben (p in beiden Fällen $0,25$).

Am zweiten Tag findet sich die stärkste mittlere Fluoreszenz in der Gruppe des mittleren Drucks ($F_6 = 45,15$), den kleinsten Wert liefert die isobare Gruppe mit $F_{\text{iso}} = 42,7$. Die Werte differieren jedoch nur gering, so daß sowohl der Globaltest ($p = 0,141$) als auch die Einzelvergleiche in allen möglichen Kombinationen an diesem Tag eine Signifikanz vermissen lassen ($p = 0,23$ für 0 mmHg gegen 6 mmHg; $p = 0,20$ für 0 mmHg gegen 12 mmHg; $p = 0,78$ für 6 mmHg gegen 12 mmHg).

Vergleichbares gilt für den dritten Tag des Beobachtungszeitraumes. Den größten Fluoreszenzwert liefert hier die Gruppe der mit CO_2 unter 12 mmHg behandelten Zellen ($F_{12} = 64,65$), den kleinsten Wert die Gruppe isobaren Kohlendioxids ($F_{\text{iso}} = 61,55$). Der Globaltest liefert einen nicht signifikanten Wert von $p = 0,512$. Auch die drei Einzelvergleiche fallen mit Werten für p , die allesamt über $0,75$ liegen, nicht signifikant aus.

Deutlich ausgeprägtere Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Kohlendioxid-Gruppen finden sich dagegen wieder am vierten Tag. Die stärkste Fluoreszenz kann hier in der Gruppe der isobarem Druck ausgesetzten Zellen gefunden werden ($F_{\text{iso}} = 74,25$). Die schwächste Fluoreszenz findet sich dagegen in der Gruppe des maximalen Drucks ($F_{12} = 65,9$). Der globale Test fällt mit $p < 0,01$ deutlich signifikant aus. Auch die Einzelvergleiche zwischen der isobaren Gruppe einerseits und den beiden hyperbaren Gruppen andererseits erklären die jeweiligen Unterschiede als statistisch relevant ($p = 0,04$ für 0 mmHg gegen 6 mmHg sowie $p < 0,01$ für 0 mmHg gegen 12 mmHg). Nicht mehr signifikant dagegen ist der Unterschied zwischen den beiden hyperbaren Gruppen ($p = 0,066$). Auch am fünften Tag liefert der Globaltest ein deutlich signifikantes Ergebnis ($p < 0,01$). Entsprechendes findet sich beim Vergleich zwischen der 12-mmHg-Gruppe einerseits und den anderen beiden CO_2 -Gruppen andererseits. Nur dem Unterschied zwischen den beiden Gruppen geringen Drucks kommt keine Bedeutung im statistischen Sinne zu ($p = 0,77$). Die stärkste Fluoreszenz kann hier in der isobaren ($F_{\text{iso}} = 8,8$), die schwächste in der 12-mmHg-Gruppe ($F_{12} = 11,1$) gemessen werden. Die im Vergleich zu den Vortagen deutlich niedrigeren Werte ergeben sich wieder aus der Tatsache, daß aus den oben geschilderten Gründen die Ausgangszellzahlen eines jeden Loches in den Platten von 5.000 auf 1.000 reduziert worden sind.

Die Rangliste der mittleren Fluoreszenzen des siebten Tages entspricht der des fünften. Jedoch fällt hier der Globaltest mit einem $p = 0,079$ nicht signifikant aus. Auch der Dunn-Test für die drei Einzelvergleiche der Kohlendioxidgruppen untereinander ergibt durchweg Ergebniswerte von $p > 0,1$.

Am neunten Tag kann in der Gruppe des größten Druckes die stärkste mittlere Fluoreszenz gefunden werden ($F_{12} = 26,4$). Der kleinste Mittelwert findet sich in der isobaren Gruppe ($F_{\text{iso}} = 19,0$). Der Globaltest liefert einen Wert von $p < 0,01$. Das gleiche Ergebnis findet sich bei den Vergleichen zwischen der 12-mmHg-Gruppe einerseits und den beiden Gruppe geringeren Druckes andererseits. Der Vergleich zwischen den beiden letztgenannten Gruppen liefert einen Wert von $p = 0,019$.

Am elften Tag des Beobachtungszeitraumes ist die Fluoreszenz im Durchschnitt wieder am stärksten in der 12-mmHg-Gruppe ausgeprägt ($F_{12} = 37,9$). Der kleinste Wert ist in der Gruppe zdes mittleren Drucks zu finden ($F_6 = 32,9$). Wiederum ist der Globaltest mit $p < 0,01$ deutlich signifikant. Dasselbe kann für den Vergleich der beiden hyperbaren Gruppen untereinander sowie für den Vergleich zwischen der isobaren und mit der 6-mmHg-Gruppe gefunden werden. Statistisch nicht relevant dagegen ist der Unterschied zwischen der isobaren und der 12-mmHg-Gruppe ($p = 0,51$).

An den letzten beiden Beobachtungstagen fallen sowohl die Einzelvergleiche als auch die Globaltests durchweg nicht signifikant aus. Das globale p des dreizehnten Tages beträgt $p = 0,136$; auch die Einzelvergleiche liegen allesamt bei Werten von $p > 0,1$. Noch deutlicher sind die Ergebnisse am fünfzehnten Tag. Hier liegen sowohl der Globalwert als auch die drei Einzelwerte nahe dem Einhundert-Prozent-Niveau.

3.3 Zusatzversuche

3.3.1 Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz

Die folgende Grafik (*Abbildung 15*) gibt die Ergebnisse aus der Anlage der Fluoreszenz-Standardkurve für die Zellen des Kolonkarzinoms CX-2 und des Pankreaskarzinoms DAN-G wieder. Sie erlaubt die ungefähre Zuordnung von im UV-Photometer gemessenen Fluoreszenzen zu konkreten Zellzahlen. Wie man aus der Grafik ersehen kann, sind die beiden Kurvenverläufe entsprechend dem linearen Anstieg der Zellzahlen in jedem Loch einer Reihe ebenfalls linear. Nur bei der Zellzahl von 30.000 tritt eine leichte Abflachung des Kurvenverlaufs ein. Dies hängt jedoch damit zusammen, daß bis hierher die Zellzahlen in 5.000-Schritten gesteigert worden sind und ab hier die weitere Steigerung in 10.000-Schritten bis maximal 90.000 Zellen pro Loch in der letzten Reihe erfolgt.

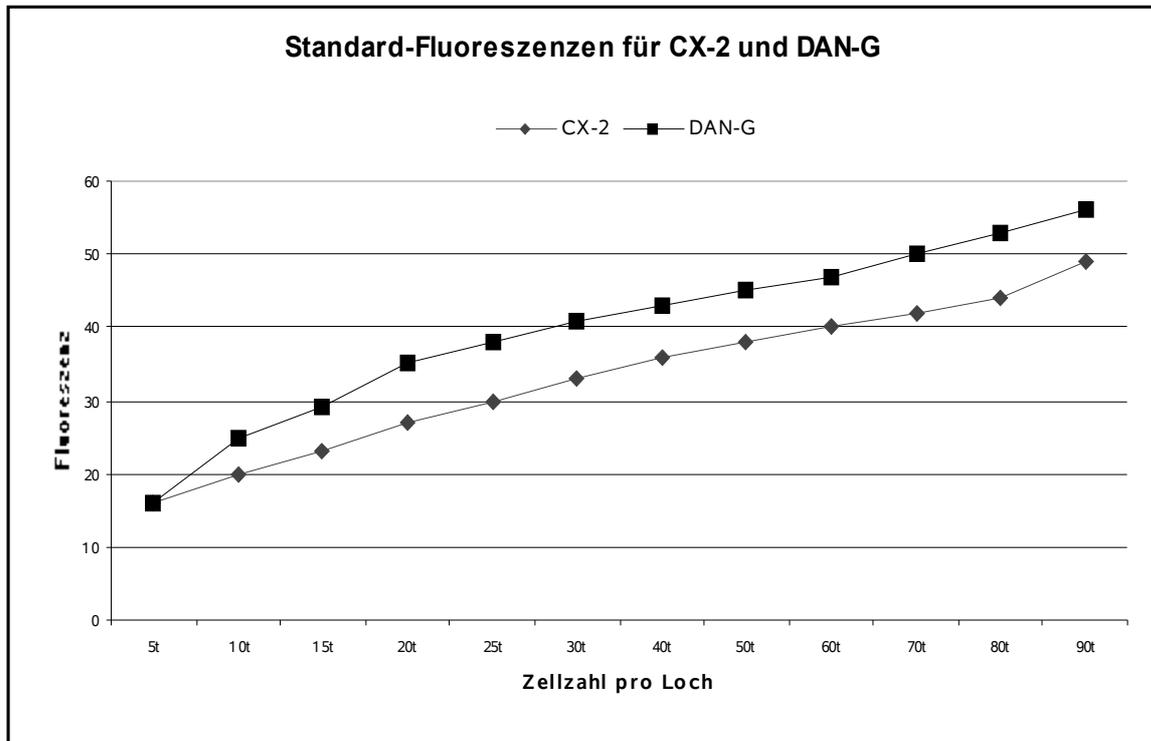


Abbildung 14: Zellzahl-Fluoreszenz-Beziehung für CX-2 und DAN-G

3.3.2 Plateaubestimmung

Die folgenden Abbildungen geben die Ergebnisse aus den Plateaubestimmungen für CX-2 und DAN-G wieder. Für jeden der beiden Zelltypen wurde eine Bestimmung mit zum einen 5.000 Zellen pro Loch, zum anderen 1.000 Zellen pro Loch durchgeführt. Die Anzahl der Wachstumstage eines jeden Ansatzes kann auf der Ordinate abgelesen werden. Es zeigt sich, daß im Falle des Ansatzes mit 5.000 Zellen pro Loch die Proliferationskurve der Zellen des Pankreaskarzinoms DAN-G ab dem sechsten Wachstumstag abflacht. Entsprechendes kann auch für die Zellen des Kolonkarzinoms CX-2 gefunden werden, wobei hier die Abflachung des Kurvenverlaufes noch prägnanter ist als im vorgenannten Fall von DAN-G.

Für die beiden Ansätze mit einer Zahl von 1.000 Zellen pro Loch kann – nach einem anfänglich stetigen stufenweisen Ansteigen der Kurve – ebenfalls ein Übergang in eine Plateauphase gegen Ende des Beobachtungszeitraumes gefunden werden. Im Falle des Kolonkarzinoms CX-2 liegt der Zeitpunkt hierfür etwa am neunzehnten, im Falle des Pankreaskarzinoms DAN-G etwa am achtzehnten Wachstumstag.

Anhand der Proliferationskurven für die Ansätze mit einer Zahl von 5.000 Zellen pro Loch ist die Notwendigkeit zu erkennen, für die Versuche zur quantitativen DNA-Bestimmung ab dem fünften Tag die Zellzahl pro Loch zu reduzieren. Der Übergang der Proliferationskurve in eine Plateauphase ab dem sechsten Tag zeigt an, daß hier die Löcher bereits vollgewachsen sind. Eine weitere Proliferation der Zellen ist damit nicht mehr möglich, und die Ergebnisse wären daher nicht mehr verwertbar. Demgegenüber kann im Falle des Ansatzes mit einer Zahl von 1.000 Zellen pro Loch gesehen werden, daß auch am fünfzehnten Tag – und damit am letzten Tag des Beobachtungszeitraumes für die quantitative DNA-Bestimmung – in den Löchern noch immer genügend Platz für eine Proliferation der Zellen sowohl von CX-2 als auch von DAN-G vorhanden ist. Eine Hemmung der Zellproliferation durch ein Vollwachsen der Löcher und damit eine Verfälschung der Meßergebnisse ist damit nicht zu befürchten (*Abbildungen 15-18*).

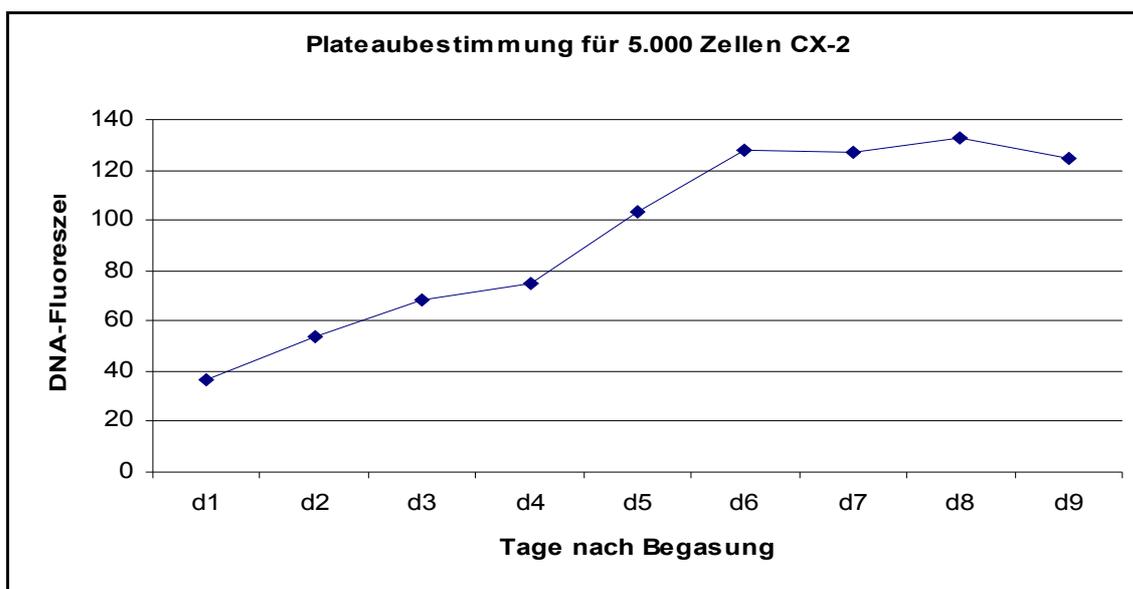


Abbildung 15: Plateaubestimmung für CX-2 bei einer Ausgangszahl von 5.000 Zellen pro Loch

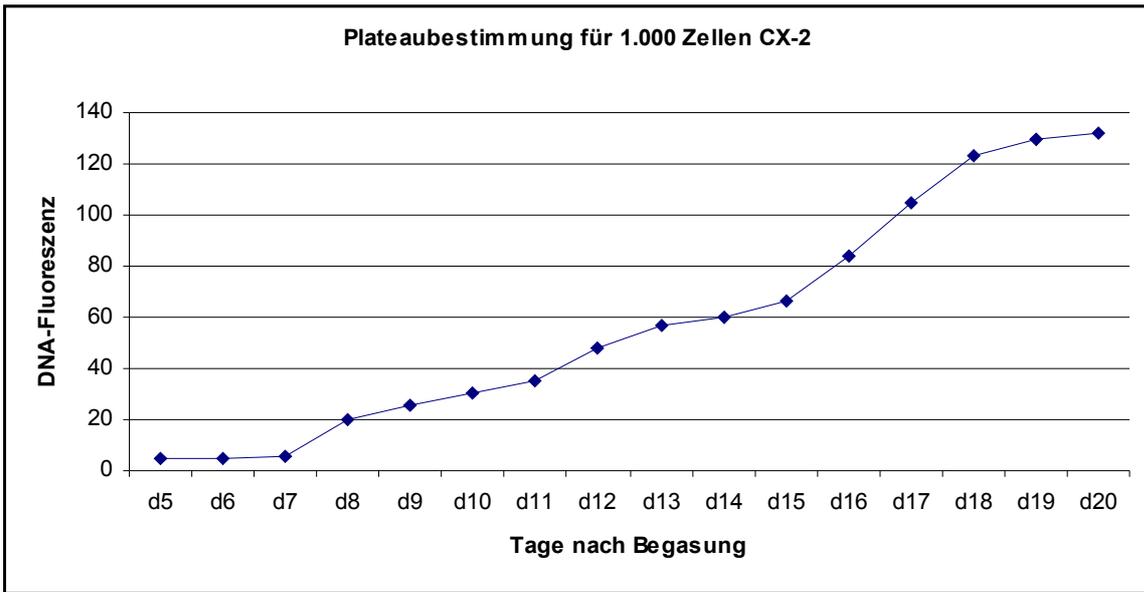


Abbildung 16: Plateaubestimmung für CX-2 bei einer Ausgangszahl von 1.000 Zellen pro Loch

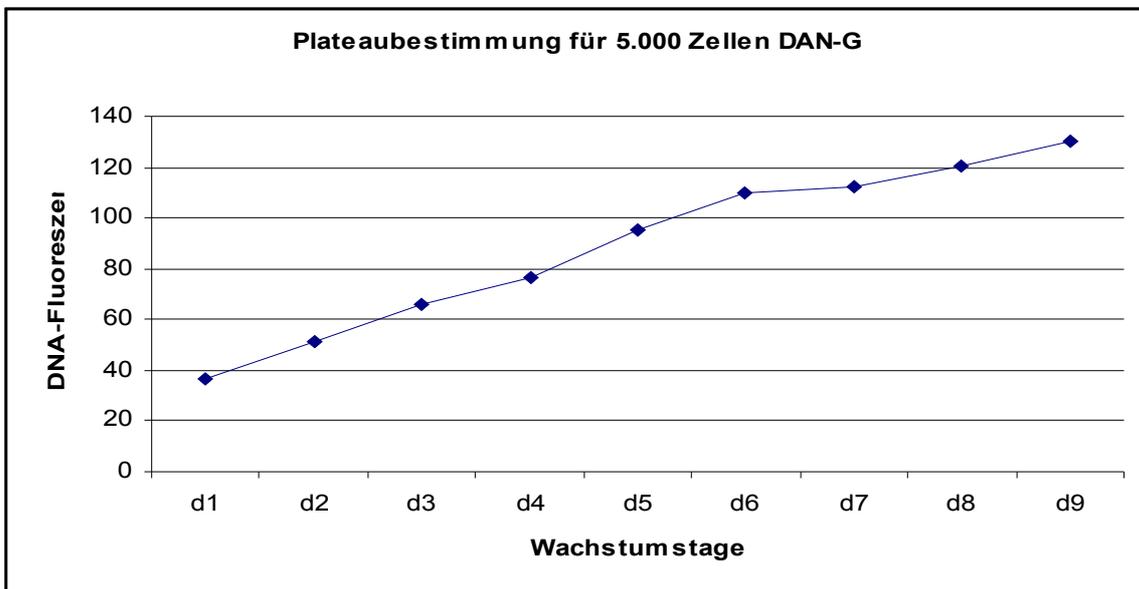


Abbildung 17: Plateaubestimmung für DAN-G bei einer Ausgangszahl von 5.000 Zellen pro Loch

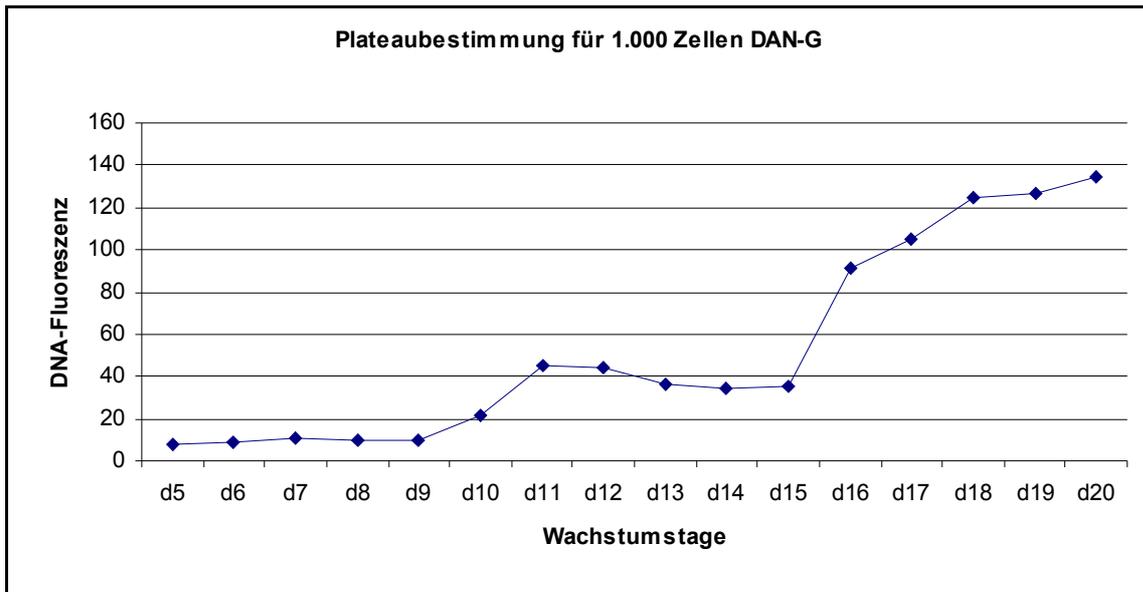


Abbildung 18: Plateaubestimmung für DAN-G bei einer Ausgangszahl von 1.000 Zellen pro Loch.

3.4 Zusammenfassung

Im ersten Vorversuch zeigt sich, daß innerhalb der ersten fünf Tage nach der CO₂-Exposition signifikante Unterschiede zwischen den Zahlen der Kontrollgruppenzellen einerseits und denen der Kohlendioxidgruppenzellen andererseits auftreten, wobei die Zahlen der mit Kohlendioxid behandelten Zellen gegenüber denen ihrer Kontrollgruppe erniedrigt sind. Auch beim Vergleich der drei Kohlendioxidgruppen einer Zelllinie untereinander ergeben sich zum Teil signifikante Unterschiede.

Im zweiten Vorversuch ist zu sehen, daß mit zunehmendem Druck des Kohlendioxids nach vierstündiger Behandlung des Mediums der entsprechenden Gruppen mit CO₂ die Wasserstoffionen-Konzentration proportional zum eingestellten Druck des Gases zunimmt, während sie in der Kontrollgruppe konstant bleibt.

Kohlendioxid führt also mit steigendem Druck zu einer zunehmenden Ansäuerung des Nährmediums der Zellkulturen.

Im ersten der Hauptversuche konnte durch Anfärbung nekrotischer Zellen mit Propidiumiodid gezeigt werden, daß mit steigendem Druck Kohlendioxid außerdem zu einer proportional zunehmenden Zahl an nekrotischen Zellen führt.

Der zweite Hauptversuch hat die Bestimmung des Proliferationsverhaltens der mit Kohlendioxid behandelten Zellen von CX-2 und DAN-G zum Ziel.

Bei beiden Zelllinien ist an den ersten Tagen die Proliferation der mit Kohlendioxid behandelten Zellen gegenüber der der Zellen der Kontrollgruppe vermindert. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe werden hierbei bis zum vierten Tag zunehmend geringer. Am fünften Tag kehrt sich die Aktivität der untersuchten Zellen um. Nun nimmt - ebenfalls bei beiden Zelllinien - das Wachstum der Kohlendioxidgruppen-Zellen gegenüber dem der Zellen der Kontrollgruppe weiter zu. Vor allem bei den Zellen des Kolonkarzinoms CX-2 besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Drucks des

Kohlendioxids und der Zeitdauer, über welche die mit CO₂ behandelten Zellen verstärkt proliferieren. Je höher der Druck des Gases während der Exposition der Zellen gewesen ist, desto länger hält die verstärkte Proliferation der so behandelten Zellen an. Erst am dreizehnten Tag sind die von den ersten vier Tagen bekannten Verhältnisse wieder hergestellt.

Im Falle des Pankreaskarzinoms DAN-G findet sich ebenfalls eine verstärkte Proliferation der mit CO₂ behandelten Zellen ab dem fünften Tag. Dies gilt für alle drei Kohlendioxidgruppen. Im Gegensatz zu CX-2 ändert sich das Proliferationsverhalten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht mehr.

4. DISKUSSION

Die Anfänge der laparoskopischen Chirurgie liegen nunmehr beinahe zweihundert Jahre zurück. Im Jahre 1805 benutzte Bozzini ein einfaches selbstentwickeltes Endoskop zur Inspektion der Harnblase (1). In den darauf folgenden einhundert Jahren kam es zu verschiedenen Weiterentwicklungen dieses Instruments (4, 5, 6, 7), bis 1901 Kelling die erste endoskopische Untersuchung der Bauchhöhle durchführte. Dank weiterer Verbesserungen des Instrumentariums konnten dann in der Mitte der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts die Voraussetzungen für die heutige endoskopische Chirurgie geschaffen werden (2, 3, 4, 5).

Zu den vielen Vorteilen, welche die minimalinvasive Operationsmethode gegenüber der konventionellen Technik zu bieten hat, gehören vor allem die aufgrund der kleineren Schnitte günstigere Wundheilung (130, 131), eine schnellere Mobilisation der Patienten und hierdurch eine geringere Rate an postoperativen Komplikationen (88) wie Pneumonien, Thrombosen und Embolien, was sich gerade bei älteren Patienten bemerkbar macht (78). Damit können zudem verkürzte Liegezeiten und Verweildauern im Krankenhaus (21) einhergehen.

Hinsichtlich der operationsbedingten Beeinträchtigung der Immunfunktionen haben Untersuchungen Vorteile der minimalinvasiven Technik gegenüber der konventionellen Laparotomie zeigen können (23, 24, 26, 28, 35, 48, 55, 75, 86, 129).

Die eingangs geschilderten Vorteile der Laparoskopie gegenüber der Laparotomie haben in den vergangenen Jahren zu dem Wunsch geführt, nun auch onkologische Patienten mit dieser Technik zu operieren. Auch für die Resektion maligner Tumoren ist die Laparoskopie nicht nur technisch anwendbar (21), sondern sie kann auch für den postoperativen Verlauf Vorteile gegenüber dem Zugang mittels einer Laparotomie bieten (23, 24, 39). Jedoch herrschen noch Unsicherheiten bezüglich der mechanischen Effekte der Laparoskopie, der Auswirkungen des erhöhten intraabdominellen Drucks, des Einflusses des CO₂-Pneumoperitoneums auf das intraperitoneale Milieu und der Auswirkungen des Pneumoperitoneums auf das Wachstum intraperitonealer Tumore und intraperitonealer Metastasen. Eine große Zahl an vor allem tierexperimentellen Untersuchungen hatte in den vergangenen Jahren zum Ziel, diese Unsicherheiten, die derzeit noch den Einsatz der minimalinvasiven Technik für die Resektion maligner Tumore limitieren, zu beseitigen.

Jedoch scheint die Reaktion des Wirtsorganismus auf die Inokulation von Tumorzellen bereits sehr komplex zu sein. Einen weiteren Störfaktor für die systemischen Immunfunktionen des Versuchstiers stellt auch die im Rahmen des Experiments stattfindende Operation dar. Das Pneumoperitoneum selbst beeinträchtigt außerdem auch die lokale Immunfunktion des Peritoneums.

Angesichts dieser möglichen Störgrößen bezüglich der Interaktion zwischen inokuliertem Tumor und dem Organismus des Versuchstiers wird es hier als um so wichtiger erachtet, zunächst durch in-vitro-Versuche eingehende Kenntnisse über das Verhalten isolierter Tumorzellen zu gewinnen. Hierdurch kann die Planung späterer Tierversuche effizienter gestaltet werden. Weiterhin wird es möglich, besser zwischen primärer Reaktion der Tumorzellen einerseits und versuchsbedingten systemischen oder lokal-peritonealen Veränderungen andererseits zu unterscheiden. Die Validität der so gewonnenen Ergebnisse kann auf diese Weise erhöht werden.

Ein unter ethischen Gesichtspunkten positiver Aspekt ist außerdem die Möglichkeit, den Verbrauch an Versuchstieren zu reduzieren.

Die vorliegende Arbeit hat daher die Untersuchung des Proliferationsverhaltens humaner Karzinomzellen unter einem in vitro simulierten Pneumoperitoneum zur Zielsetzung. Sie versteht sich als Grundlagenarbeit zur Proliferationskinetik der vorgestellten Tumorzellen. Komplexe Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirtssystem, wie sie in Tierversuchen zu finden sind, sollen durch den in-vitro-Ansatz ausgeschlossen und nur die Reaktionen der Zellen auf eine möglichst geringe Zahl an Störgrößen beobachtet werden.

Es werden hierzu zwei verschiedenen Zelllinien humanen Ursprungs in die Untersuchungen einbezogen. Zum einen ist dies das Kolonkarzinom CX-2, zum anderen das Pankreaskarzinom DAN-G. Die beiden Zelllinien sind sich in bezug auf ihre Kulturintervalle und ihre Verdopplungszeiten sehr ähnlich. Zudem benötigen sie dasselbe Nährmedium. Sie sind aufgrund dieser Gemeinsamkeiten gerade hinsichtlich ihrer Proliferationskinetik, die ja untersucht werden soll, sehr gut vergleichbar.

Diese Arbeit besteht in den Vorarbeiten und im Hauptteil aus jeweils zwei Experimenten. Diese werden ergänzt durch zwei zusätzliche Versuche, die dazu dienen, den im Hauptteil erhaltenen dimensionslosen Werten konkrete Zellzahlen zuzuordnen zu können.

Die **Vorversuche** bestehen zum einen aus einer auf einen fünftägigen Zeitraum beschränkten einfachen Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer, zum anderen aus der Bestimmung des pH-Wertes des Nährmediums der Tumorzellen nach deren Exposition gegenüber Kohlendioxid.

Für den ersten Vorversuch sind vor Beginn der Zählungen sowohl für das Pankreaskarzinom DAN-G als auch für das Kolonkarzinom CX-2 vier Gruppen gebildet worden, von denen eine aus nicht zu behandelnden Kontrollzellen besteht. Die restlichen drei Gruppen bestehen aus Zellen, die zuvor über vier Stunden mit Kohlendioxid bei Drücken von null, sechs und zwölf mmHg behandelt worden sind. Ziel dieses ersten Vorversuchs ist es festzustellen, inwieweit Kohlendioxid alleine überhaupt in der Lage ist, eine Änderung des Proliferationsverhaltens der Karzinomzellen zu induzieren, und ob eine Veränderung des Drucks zu einer weiter differenzierten Veränderung des Proliferationsverhaltens führt. Es zeigt sich, daß vom zweiten bis zum fünften Tag nach der CO₂-Exposition signifikante Unterschiede zwischen den Zahlen der Kontrollgruppenzellen einerseits und denen der Kohlendioxidgruppenzellen andererseits bestehen. Die Zahlen der mit Kohlendioxid behandelten Zellen sind dabei gegenüber denen ihrer Kontrollgruppe erniedrigt. Auch beim Vergleich der drei Kohlendioxidgruppen einer Zelllinie ergeben sich zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Druckgruppen.

Man kann somit zu diesem Zeitpunkt davon ausgehen, daß nicht nur das Kohlendioxid alleine einen Einfluß auf die Proliferationskinetik der behandelten Zellen hat, sondern auch der Druck, unter dem es steht. Es erscheint daher sinnvoll, diese orientierende Kurzzeituntersuchung durch eine auf einen längeren Zeitraum angelegte Untersuchung mit sensitiveren Nachweismethoden zu ergänzen.

Der zweite der beiden Vorversuche besteht in der Bestimmung des pH-Wertes des Mediums nach erfolgter vierstündiger Behandlung mit Kohlendioxid unter den verschiedenen einzustellenden Drücken. Dies dient nicht der Untersuchung der Proliferationskinetik von CX-2 und DAN-G. Vielmehr soll diese Untersuchung eine Orientierung bieten, um die versuchsbedingten Belastungen abschätzen zu können, denen die Zellen und das Nährmedium während und unmittelbar nach der Einwirkung des Kohlendioxids ausgesetzt sind. Der Versuchsansatz ist mit dem der übrigen

Versuche identisch. Auch hier werden drei Kohlendioxidgruppen und als Referenz eine Kontrollgruppe gebildet.

Es zeigt sich, daß mit zunehmendem Druck des Kohlendioxids nach vierstündiger Behandlung des Mediums der entsprechenden Gruppen die Wasserstoffionen-Konzentration proportional zum eingestellten Druck zunimmt, während sie in der Kontrollgruppe konstant bleibt.

Die hier gefundenen Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, sowohl unmittelbar vor Beginn der CO₂-Einwirkung als auch an den nachfolgenden Tagen einen regelmäßigen Mediumwechsel durchzuführen, um eine mögliche unerwünschte Beeinflussung des Zellwachstums über die Expositionszeit hinaus zu vermeiden. Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse aber auch auf einen möglichen Störfaktor in Form der CO₂-bedingten Azidose des Kulturmediums hin, der durch die beschriebene Vorgehensweise zwar möglichst klein gehalten, jedoch nie vollständig ausgeschaltet werden kann. Bei der Betrachtung der im Hauptteil gefundenen Resultate muß also immer auch bedacht werden, daß ein reduziertes Zellwachstum zumindest zeitweise und zum Teil auch durch ein temporär übersäuertes Medium mitbedingt sein kann.

Es ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, daß es sich hierbei ausschließlich um Messungen des extrazellulären Milieus handelt. Intrazelluläre pH-Wert-Veränderungen werden mit dem beschriebenen Versuchsaufbau nicht gemessen. Auch lassen extrazelluläre Veränderungen des pH-Wertes keinen direkten Rückschluß auf eventuelle intrazelluläre pH-Anstiege oder -Abfälle zu. Zelleigene Regulationsmechanismen sorgen für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase und können so die Auswirkungen extrazellulärer Veränderungen auf den Intrazellulärraum in Grenzen kompensieren. Dies zu messen könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Durchflußzytometrische Techniken stellen hier ein vergleichsweise einfaches und elegantes Instrumentarium dar.

In den **Hauptversuchen** werden Zellen des menschlichen Kolonkarzinoms CX-2 und des humanen Pankreaskarzinoms DAN-G wieder über vier Stunden mit Kohlendioxid unter Drücken von null, sechs und zwölf mmHg behandelt. Diese drei Gruppen werden ebenfalls mit einer Gruppe unbehandelter Zellen verglichen, die während des Zeitraums der Exposition unter Raumluftbedingungen gehalten worden sind.

Der erste der beiden Hauptversuche besteht in der Anfärbung und Markierung nekrotischer Zellen und hat zum Ziel, die vermuteten zytotoxischen Effekte des Kohlendioxids und des Drucks auf die zu untersuchenden Zellen zu objektivieren. Hierzu werden die nekrotischen Zellen der einzelnen CO₂-Gruppen mit Propidiumiodid markiert und deren Anteil an der Gesamtpopulation im Durchflußzytometer gemessen. Als Negativkontrolle dienen die unbehandelten Zellen, als Positivkontrolle dienen Ansätze, deren Zellen zuvor mit Formalin abgetötet worden sind.

Als Ergebnis aus diesen Versuchen kann festgestellt werden, daß das Kohlendioxid tatsächlich eine zellschädigende Wirkung hat. Diese Wirkung ist direkt abhängig von dem Druck, mit dem das Gas auf die zu behandelnden Zellen einwirkt. Die Zahl der toten Zellen nimmt mit steigendem Druck zu.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch während einer laparoskopischen Operation intraperitoneal kohlendioxid- und druckbedingte zellschädigende Vorgänge ablaufen, und dies um so mehr, als im Menschen der maximale Druck von 12 mmHg angelegt wird. Für die laparoskopische Tumorchirurgie, vor deren Hintergrund diese Arbeit durchgeführt worden ist, kann dies verschiedene Konsequenzen haben.

Zum einen kann davon ausgegangen werden, daß die beschriebenen zytotoxischen Effekte des pneumoperitonealen Milieus auch einen eventuellen intraperitoneal gelegenen Tumor nicht verschonen. Diese Vermutung deckt sich mit den Ergebnissen,

die andernorts im Tierversuch gewonnen werden konnten (93). Mit Kohlendioxid behandelte Zellen zeichneten sich dort durch ein deutlich weniger invasives Verhalten aus und waren deutlich weniger vital als Zellen, die mit Luft oder Lachgas behandelt worden waren. Auch Takiguchi et al. (131) kommen im Tierversuch zu dem Ergebnis, daß ein CO₂-Pneumoperitoneum einen toxischen Effekt auf Karzinomzellen hat. Es ist allerdings fraglich, ob dieser Effekt auch klinisch bedeutsam ist. Die vorliegende Arbeit vermag hierüber keinen Aufschluß zu geben.

Zum anderen muß weiterhin bedacht werden, daß die zytotoxischen Effekte eines CO₂-Pneumoperitoneums sich nicht nur auf die Zellen des Tumors, sondern auch auf peritoneale Zellen auswirken können. Dies hätte eine Störung der peritonealen Integrität und damit auch der peritonealen Immunfunktion zur Folge, was dann wiederum eine Metastasierung eines Tumors begünstigen könnte.

Neben diesen lokalen Effekten dürfen aber schließlich auch die systemischen Auswirkungen des Pneumoperitoneums nicht außer acht gelassen werden. Verschiedene Studien hierzu liegen bereits vor (28, 35, 45, 61, 74, 75, 132, 133). So kann bei Patienten während einer Laparoskopie mit CO₂-Pneumoperitoneum eine respiratorische Azidose auftreten. Im Tierversuch wurden im Zusammenhang mit einem CO₂-Pneumoperitoneum Einschränkungen der systemischen Immunfunktionen festgestellt, die denen ähnlich sind, die man nach konventionellen Laparotomien beobachten kann (45). Jedoch ist es auch hier wieder unklar, inwieweit diesen Veränderungen eine klinische Relevanz zukommt. Auch diese Frage zu beantworten, ist nicht Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

Der zweite Hauptversuch stellt die umfangreichste Versuchsreihe innerhalb der vorliegenden Arbeit dar. Mit ihm erfolgt durch den Einsatz von Pico Green zur fluoreszenzphotometrischen DNA-Quantifizierung zum einen und durch die Ausweitung des Beobachtungszeitraumes von fünf auf fünfzehn Tage zum anderen eine Verbesserung der Nachweismethoden der Zählkammer-Versuche.

Durch den Einsatz von Pico Green werden selektiv nekrotische Zellen detektiert, apoptotische Zellen bleiben unerkannt. Damit kann bei den vorliegenden Ergebnissen sicher davon ausgegangen werden, daß die erhöhte Absterberate unter mit CO₂ verschiedener Drücke behandelten Zellen auf eine zytotoxische Wirkung von Kohlendioxid zurückzuführen ist, die mit steigendem Druck des Gases zunimmt. Zunehmende Drücke von Kohlendioxid führen dagegen zu keiner beschleunigten Apoptose.

Die Ausweitung des Beobachtungszeitraums hat Konsequenzen für die Zellkultivierung in den für die Messungen verwandten 96-Loch-Platten: Würde man auch für die Zeit nach dem fünften Tag Kulturen mit einer Ausgangszahl von 5.000 Zellen pro Loch ansetzen, wären die Löcher bereits vor Ende des Versuchszeitraumes so weit überwachsen, daß eine Veränderung des Proliferationsverhaltens nicht mehr erkennbar wäre. Daher muß für die Zeit nach dem vierten Tag die Zellzahl auf 1.000 pro Loch reduziert werden. Diese Zahl hat sich für eine Beobachtung des Proliferationsverhaltens bis zum fünfzehnten Tag als am besten geeigneter herausgestellt. Die nicht ausreichende Sensitivität des Nachweisverfahrens erlaubt es nicht, alle Kulturen mit einer Ausgangszahl von 1.000 Zellen anzusetzen. Daß dieser Bruch in der Kontinuität der Zellkultivierung die spätere Auswertung beeinflussen kann, muß dabei berücksichtigt werden.

Sowohl im Falle des Kolonkarzinoms CX-2 als auch im Falle des Pankreaskarzinoms DAN-G ist an den ersten Tagen die Proliferation der mit Kohlendioxid behandelten Zellen gegenüber der der Zellen der Kontrollgruppe vermindert; wobei die Unterschiede zur Kontrollgruppe bis zum vierten Tag zunehmend geringer werden. Dies entspricht

den aus den Zählkammer-Versuchen gewonnenen Ergebnissen. Am fünften Tag kommt es schließlich zu einer Umkehr hinsichtlich der Aktivität der untersuchten Zellen. Nun nimmt - ebenfalls bei beiden Zelllinien - das Wachstum der Kohlendioxidgruppen-Zellen gegenüber dem der Zellen der Kontrollgruppe weiter zu. Auffällig sind hier vor allem die für das Kolonkarzinom CX-2 gefundenen Ergebnisse. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Drucks des Kohlendioxids und der Zeitdauer, über welche die mit CO₂ behandelten Zellen verstärkt proliferieren. Je höher der Druck des Gases während der Exposition der Zellen gewesen ist, desto länger hält die verstärkte Proliferation der so behandelten Zellen an. Erst am dreizehnten Tag sind die von den ersten vier Tagen bekannten Verhältnisse wieder hergestellt. Im Falle des Pankreaskarzinoms DAN-G findet sich ebenfalls eine verstärkte Proliferation der mit CO₂ behandelten Zellen ab dem fünften Tag. Dies gilt für alle drei Kohlendioxidgruppen. Im Gegensatz zu CX-2 ändert sich das Proliferationsverhalten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht mehr. Es kann an dieser Stelle nicht vorhergesagt werden, ob, bzw. wann es wieder zu einer Umkehr des Proliferationsverhaltens kommen wird.

Eine Erhöhung des CO₂-Druckes führt also

- zu einer druckabhängig erhöhten Azidität des mit CO₂ behandelten Mediums
- zu einer druckabhängig erhöhten Rate an Nekrosen in der Population der mit CO₂ behandelten Zellen
- zu einer druckabhängig gesteigerten Proliferation der mit CO₂ behandelten Zellen

Schaut man sich die Kurvenverläufe der Plateaubestimmung von CX-2 (Abb. 15 und 16) und DAN-G (Abb. 17 und 18) an, so stellt man fest, daß auch ohne den Einfluß von Kohlendioxid die Proliferation der Zellen beider Linien keinem linearen Verlauf folgt, sondern innerhalb eines zwanzigtägigen Beobachtungszeitraums Phasen gesteigerter Proliferation zu finden sind. So erfährt CX-2 einen Proliferationsschub am fünften, achten und fünfzehnten Tag, DAN-G einen solchen am elften und sechzehnten Tag. Vergleicht man diesen Verlauf mit dem Verhalten der Kontrollgruppen-Zellen, findet man identische Verläufe sowohl bei CX-2 als auch bei DAN-G. Phasenweise Proliferationsschübe scheinen demnach für beide Zelllinien physiologisch zu sein.

Diskussionswürdig ist jedoch vor allem die Frage, wie man sich die beschriebenen druckabhängigen Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen von CX-2 und DAN-G zu erklären hat.

Eine Möglichkeit könnte die Induktion eines verstärkten Zellwachstums durch die Einflüsse von Kohlendioxid und Druck sein.

Dies ist allerdings insofern fragwürdig, als es durch eine - angenommene, hier jedoch nicht gemessene - Erhöhung der intrazellulären Wasserstoffionen-Konzentration unter Kohlendioxid-Einfluß eher zu einer Beeinträchtigung der zytoplasmatischen Homöostase kommen müßte. Dies dürfte zu einer Funktionsstörung zelleigener Enzyme führen und müßte damit mit einer Beeinträchtigung der Vermehrungsfähigkeit der behandelten Zellen einhergehen. Mit den hier angewandten Methoden ist eine Messung intrazellulärer pH-Werte nicht möglich, daher können an dieser Stelle nur theoretische Überlegungen angestellt werden.

Das beobachtete Verhalten der Zellen könnte statt dessen auch als eine Art „Panikreaktion“ der Zellen auf die durch die Kohlendioxideinwirkung verschlechterte Lebensbedingungen verstanden werden. Der letztendliche Beweis hierfür kann in dieser Arbeit nicht geführt werden, und auch in der Literatur finden sich keine Untersuchungen über ein derartiges Zellverhalten. Zudem vermag diese Hypothese auch nicht hinreichend zu erklären, weshalb auch noch elf Tage nach erfolgter Exposition gegenüber CO₂ eine anhaltend gesteigerte Proliferation der Zellen beobachtet werden kann. Es ist schwer vorstellbar, daß nach einem solchen Zeitraum im intrazellulären Bereich noch Einflüsse des Kohlendioxids wirksam sein dürften. Auch diesbezüglich müßten die hier vorgelegten Ergebnisse durch geeignete weitere Untersuchungen zum intrazellulären Milieu ergänzt werden. Auch Untersuchungen zum Zellzyklus können unter diesem Aspekt sinnvoll sein. So ermöglicht die Färbung der Tumorzell-DNA mit Bromdesoxyuridin (BrdU) die Darstellung S-Phasenanteile in der jeweiligen Population.. Dies erlaubt sie Beantwortung der Frage, ob durch den Stimulus in Form von Gas oder Druck wirklich die Anzahl der Mitosen steigt.

Der Umstand, daß das Proliferationsverhalten der mit Kohlendioxid behandelten Zellen des Kolonkarzinoms CX-2 sehr deutlich druckabhängig ist, während diese Beobachtung für die Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G in dieser Form nicht gemacht werden kann, könnte als ein Hinweis darauf gewertet werden, daß die Zellen des letztgenannten Tumors gegenüber Gas und Druck weniger empfindlich sind als die des Colonkarzinoms.

In Versuchen zur Zellnekrose nach Einwirkung von Kohlendioxid unter verschiedenen Drücken jedoch war zu sehen, daß DAN-G gegenüber den Versuchsvariablen empfindlicher reagiert als CX-2, es fanden sich bei erstgenannter Zelllinie deutlich mehr Zellnekrosen als beim Kolonkarzinom. Iso- und hyperbares Kohlendioxid könnte demnach eine Früh- und eine Spätwirkung haben. In der Akutphase während (und möglicherweise auch noch unmittelbar nach) der CO₂-Exposition scheint das Kohlendioxid - abhängig vom eingestellten Druck - eine unterschiedlich hohe Zytotoxizität zu entwickeln. Nach dem Ende der Exposition läßt deren Wirkung dann jedoch nach und ist am ersten Tag nach der CO₂-Behandlung nicht mehr festzustellen. Die Tumorzellen der CO₂-Gruppen proliferieren stetig, allerdings weniger ausgeprägt als die der Kontrollgruppen. Die Tatsache, daß am Ende der ersten Woche nach Exposition die Kohlendioxidgruppen-Zellen stärker proliferieren als die der Kontrollgruppe, könnte man sich unter Hinzuziehung der Ergebnisse aus der Nekrosefärbung erklären.

So wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß durch den Einfluß des Kohlendioxids und des Drucks eine so starke Zellschädigung eintritt, daß es zum Absterben eines Teils der Populationen in den Lochplatten kommt. Die überlebenden Zellen könnten zunächst geschwächt und damit in ihrer Vermehrungsfähigkeit vorübergehend eingeschränkt sein, während die Zellen der Kontrollgruppen unbeeinflusst bleiben. Die daher normal weiterproliferierenden Kontrollgruppenzellen könnten die Löcher in den Platten mit der Zeit immer mehr ausfüllen. Da die Effektivität der Zellvermehrung jedoch abhängig ist von dem den Zellen zur Verfügung stehenden Platzangebot in den Kulturplatten., wäre dieses im Falle der Kohlendioxidgruppen-Zellen größer als in dem der Kontrollgruppen, da ja durch den Einfluß des Kohlendioxids Zellen abgetötet worden sind und somit wieder mehr Raum für die Zellvermehrung zur Verfügung stehen könnte. Zudem würde in den Platten mit verringerter Zellzahl den verbliebenen Zellen relativ mehr Nährmedium zur Verfügung stehen, was die weitere Proilferation ebenfalls begünstigen kann. Zusätzlich wäre auch denkbar, daß die Kohlendioxidgruppen-Zellen in den ersten Tagen nach CO₂-Exposition noch geschwächt und in ihrer Aktivität reduziert sind, sich jedoch bis zum vierten Tag soweit erhohlen, daß sie dann - gewissermaßen kompensatorisch - überschießend proliferieren. Im Falle von CX-2 würde eine solche

Hyperaktivität bis zum 10. Tag anhalten. danach überwiegt wieder die Proliferation der unbehandelten Zellen.

Bei DAN-G bleibt eine Wiederherstellung des Ausgangsverhältnisses innerhalb des Beobachtungszeitraums aus, was man angesichts der in der Akutphase stärkeren Zellschädigung als eine entsprechend länger anhaltende Kompensationsphase ansehen kann.

Dieses Modell würde auch die für die Kulturen von CX-2 und DAN-G gemachten Beobachtungen erklären, wonach die Dauer der gesteigerten Proliferation mit steigendem Gasdruck zunimmt. Denn wie die Nekrose-Messungen gezeigt haben, nehmen mit steigendem Druck des Kohlendioxids auch dessen zytotoxische Effekte und damit die Absterberate der damit behandelten Zellen zu. Die Dauer der folgenden Kompensationsphase wäre demnach direkt abhängig von dem Ausmaß der CO₂- und druckbedingten Zellschädigung.

Es ist hier die Frage der klinischen Relevanz dieser Ergebnisse zu stellen. Ein In-vitro-Versuchsansatz ist ein in sich vollkommen geschlossenes System. Dies bedeutet, daß pH-Wert-Veränderungen, wie sie unter dem Einfluß des Kohlendioxids auftreten, nur sehr eingeschränkt durch die Pufferkapazitäten des Nährmediums und der Zellen selbst kompensiert werden können. Die gemessenen Veränderungen zeigen, daß durch die Versuchsbedingungen diese Kapazitäten deutlich erschöpft und aufgebraucht werden, was letztlich als Ursache für die erwähnten Zellschäden und für die Änderungen in der Proliferationskinetik angesehen werden muß. In vivo, sei dies nun im Versuchstier oder im Menschen, sind die Verhältnisse gänzlich andere. Hier existiert eine Vielzahl verschiedener Puffersysteme, durch die in sehr viel weiteren Grenzen der systemische, der lokale und der intrazelluläre pH-Wert im Normbereich gehalten werden kann. Hinzu kommt noch die Möglichkeit der respiratorischen Kompensation einer metabolischen Azidose, zumal während laparoskopischer Eingriffe der obligatorisch intubierte und kontrolliert beatmete Patient durch den Anästhesisten so weit hyperventiliert werden kann, wie dies zur Elimination des per diffusionem in den Blutkreislauf gelangten Kohlendioxids notwendig ist. Somit kann, wenn nicht schon präoperativ eine metabolisch oder respiratorisch relevante Grunderkrankung besteht, dafür gesorgt werden, daß sowohl die metabolischen als auch die respiratorischen Parameter möglichst im Normbereich bleiben. Dies kommt dann einerseits der Homöostase des Patienten - sowohl auf systemischer als auch auf lokal-peritonealer Ebene - zugute; andererseits können hiervon aber auch eventuelle Tumorzellen profitieren, deren Integrität ohne diese Kompensationsmöglichkeit durch Verschiebungen der Wasserstoffionen-Konzentration in den sauren Bereich ansonsten gefährdet wäre. Auch hier sind weitergehende Informationen nur anhand von Tiermodellen zu finden. Es ist jedoch zu fordern, daß es sich bei den zu untersuchenden Tieren um Exemplare mit Tumoren identischer Masse und identischen Volumens handelt. Zu berücksichtigen ist hierbei, daß das Verhalten des inokulierten Tumormaterials und auch die Effektivität der Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit diesem nicht sicher vorhergesagt werden können. Gerade aber der Absiedelungsort der eingebrachten Tumorzellen spielt hier eine große Rolle, da dieser einen Einfluß auf die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen hat. Denn Unterschiede im Antransport von Nährstoffen und im Abtransport von Stoffwechselprodukten bedeuten automatisch auch Unterschiede in der Reaktion des Tumorgewebes zum einen auf die Einflüsse von Kohlendioxid und Druck, zum anderen auf Maßnahmen des Wirtsorganismus zur dessen Bekämpfung.

Wie eingangs bereits erwähnt, versteht sich die hier vorgestellte Arbeit als eine Grundlagenarbeit. Ihr Ziel ist es, Informationen zu gewinnen über die Veränderungen in der Proliferationskinetik humaner Karzinomzellen nach deren Exposition gegenüber

einem in vitro simulierten Pneumoperitoneum. Die geschilderten Reaktionen sind Reaktionen eines homogenen Zellverbandes und scheinen eine Folge sowohl des Kohlendioxids als auch des eingestellten Druckes zu sein. Welche molekularen Veränderungen auf zellulärer Ebene hinter diesen Reaktionen stehen, kann mit den hier zur Anwendung gekommenen Methoden nicht erhellt werden. Dies bleibt späteren Arbeiten überlassen.

5. LITERATUR

- 1 Spaner SJ, Warnock GL: **A brief history of endoscopy, laparoscopy, and laparoscopic surgery.** J Laparoendosc Adv Surg Tech A 1997 Dez;7(6):369-73
- 2 Klaiber C, Metzger A, Petelin JB: **Manual of laparoscopic surgery.** Seattle: Hargreffe und Huber 1993
- 3 Gomella LG, Kozminski M, Wingfield HN: **Laparoscopic urologic surgery.** New York: Raven 1994
- 4 Frantizides CT (Hrsg): **Laparoscopic and thoracoscopic surgery.** St. Louis: Mosby 1995
- 5 Gaskin TA, Ische JH, Matthews JL, Winchester SB, Smith RJ: **Laparoscopy and the general surgeon.** Surg Clin North Am 1991;71(5):1085-97
- 6 Graber JN, Schultz LS, Pietrofitta JJ, Hickok DF (Hrsg): **Laparoscopic abdominal surgery.** Chicago: McGraw-Hill 1993
- 7 Peters JH, DeMeester TR (Hrsg): **Minimally invasive surgery of the foregut.** St. Louis: Quality Medical Publishing 1994
- 8 Kelling G: **Die Tamponade der Bauchhöhle mit Luft zur Stillung lebensgefährlicher Intestinalblutung.** Münchener Medizinische Wochenschr. 1901; 48:1480-3
- 9 Jacobaeus HC: **Über die Möglichkeit, die Zystoskopie bei Untersuchungen seröser Höhlen anzuwenden.** Münchener Medizinische Wochenschrift 1910;57:2090-2
- 10 Jacobaeus HC: **Über Laparo- und Thorakoskopie.** In: Brauer (Hrsg): Beiträge zur Klinik der Tuberkulose und spezifischen Tuberkuloseforschung. Münchener Medizinische Wochenschrift Nr. 40, 1912.
- 11 Kramling HJ; Lange V; Heberer G: **Aktueller Stand der Gallensteinchirurgie in Deutschland. Umfrageergebnisse und retrospektive Analyse von 27,403 Eingriffen-offene vs. laparoskopische Chirurgie** Chirurg 1993 Apr;64(4):295-302
- 12 Barkun JS, Barkun AN, Ampalis JS: **Randomised controlled trials of laparoscopic versus mini cholecystectomy.** Lancet 1992;340(4):1116-19
- 13 McMahon AJ; Russell IT; Ramsay G; Sunderland G; Baxter JN; Anderson JR; Galloway D; O'Dwyer PJ: **Laparoscopic and minilaparotomy cholecystectomy: a randomized trial comparing postoperative pain and pulmonary function.** Surgery 1994 Mai;115(5):533-9

- 14 Wexner SD, Latulippe JF: **Laparoscopic colorectal surgery and cancer.** Swiss Surg 1997;3(6):266-73
- 15 Weber DM: **Laparoscopic surgery: an excellent approach in elderly patients.** Arch Surg 2003 Oct;138(10):1083-8
- 16 Hildebrandt U; Plusczyk T; Kessler K; Menger MD: **Single-surgeon surgery in laparoscopic colonic resection.** Dis Colon Rectum 2003 Dec;46(12):1640-5
- 17 Bergamaschi R; Pessaux P; Arnaud JP: **Comparison of conventional and laparoscopic ileocolic resection for Crohn's disease.** Dis Colon Rectum 2003 Aug;46(8):1129-33
- 18 Lauter DM; Serna S: **Surgeon experience with laparoscopic-assisted colorectal surgery in Washington State.** Am J Surg 2003 Jul;186(1):13-6
- 19 Veldkamp R; Gholghesaei M; Bouvy ND; Kazemier G; Bonjer HJ: **Laparoscopic resection of colonic cancer.** Scand J Surg 2003;92(1):97-103
- 20 Meyer C, de Manzini N, Rohr S, Thiry CL, Perim-Kalil FC, Bachellier-Billot C: **1000 cases of cholecystectomy: 500 by laparotomy versus 500 by laparoscopy.** J Chir 1993 Dez;130(12):501-6
- 21 Passone-Szerzyna N, Navez B, Cambier E, Baert G, Richir C, Guiot P: **Laparoscopic cholecystectomy in the elderly patient.** Ann Chir 1995;49(4):291-5
- 22 Jorgensen JO, Lalak NJ, Hunt DR: **Is laparoscopy associated with a lower rate of postoperative adhesions than laparotomy? A comparative study in the rabbit.** Aust N Z J Surg 1995 Mai;65(5):342-4
- 23 Schirmer BD: **Laparoscopic colon resection.** Surg Clin North Am 1996 Jun;76(3):571-83
- 24 Muzii L, Marana R, Marana E, Paielli FV, Meo F, Maussier ML, Sciarra M, Mancuso S: **Evaluation of stress-related hormones after surgery by laparoscopy or laparotomy.** J Am Assoc Gynecol Laparosc 1996 Feb;3(2):229-34
- 25 Aldrighetti L, Giacomelli M, Calori G, Paganelli M, Ferla G: **Impact of minimally invasive surgery on adrenalectomy for incidental tumors: comparison with laparotomic technique.** Int Surg 1997 Apr-Jun;82(2):160-4
- 26 Junghans T, Bohm B, Schwenk W, Grundel K, Muller JM: **Progress in laparoscopic sigmoid resection in elective surgical therapy of sigmoid diverticulitis.** Langenbecks Arch Chir 1997;382(5):266-70
- 27 Tung PH, Wang Q, Ogle CK, Smith CD: **Minimal increase in gut-mucosal interleukin-6 during laparoscopy.** Surg Endosc 1998 Mai;12(5):409-11
- 28 Rosen MJ; Malm JA; Tarnoff M; Zuccala K; Ponsky JL: **Cost-effectiveness of ambulatory laparoscopic cholecystectomy.** Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 2001 Jun;11(3):182-4

- 29 Guazzoni G, Montorsi F, Bergamaschi F, Bellinzoni P, Centemero A, Consonni P, Rigatti P: **Open surgical revision of laparoscopic pelvic lymphadenectomy for staging of prostate cancer: the impact of laparoscopic learning curve.** J Urol 1994 Apr;151(4):930-3
- 30 Trokel MJ, Bessler M, Treat MR, Whelan RL, Nowygrod R: **Preservation of immune response after laparoscopy.** Surg Endosc 1994 Dez;8(12):1385-7; Diskussion 1387-8
- 31 Gitzelmann CA, Mendoza-Sagaon M, Talamini MA, Ahmad SA, Pegoli W Jr, Paidas CN: **Cell-mediated immune response is better preserved by laparoscopy than laparotomy.** Surgery 2000 Jan; 127(1):65-71
- 32 Mendoza-Sagaon M, Kutka MF, Talamini MA, Poulouse BK, Herreman-Suquet K, de Maio A, Paidas CN: **Laparoscopic Nissen fundoplication with carbon dioxide pneumoperitoneum preserves cell-mediated immunity in an immature animal model.** JPediatrSurg 2001 Okt; 36(10):1564-8
- 33 Evrard S, Falkenrodt A, Park A, Tasseti V, Mutter D, Marescaux J: **Influence of CO2 pneumoperitoneum on systemic and peritoneal cell-mediated immunity.** World J Surg 1997 Mai;21(4): 353-6
- 34 Anania A, Marchigiano E, Pene G, Cascio G, Morino M: **Transient immunosuppression after abdominal surgical intervention.** Recenti Prog Med 1998 Jun;89(6):296-300
- 35 Kehlet H, Nielsen HJ: **Impact of laparoscopic surgery on stress responses, immunofunction, and risk of infectious complications.** New Horiz 1998 Mai;6(2 Suppl):80-8
- 36 Vittimberga FJ Jr, Foley DP, Meyers WC, Callery MP: **Laparoscopic surgery and the systemic immune response.** Ann Surg 1998 Mar;227(3):326-34
- 37 Carter JJ, Whelan RL: **The immunologic consequences of laparoscopy in oncology.** Surg Oncol Clin N Am 2001 Jul;10(3):655-77
- 38 Gupta A, Watson DI: **Effect of laparoscopy on immune function.** Br J Surg 2001, 88, 1296-1306
- 39 Vallina VL, Velasco JM: **The influence of laparoscopy on lymphocyte subpopulations in the surgical patient.** Surg Endosc 1996 Mai;10(5):481-4
- 40 Hewitt PM, Ip SM, Kwok SP, Somers SS, Li K, Leung KL, Lau WY, Li AK: **Laparoscopic-assisted vs. open surgery for colorectal cancer: comparative study of immune effects.** Dis Colon Rectum 1998 Jul;41(7):901-9
- 41 Smit MJ, Beelen RH, Eijsbouts QA, Meijer S, Cuesta MA: **Immunological response in laparoscopic surgery.** Acta Gastroenterol Belg 1996 Okt-Dez;59(4): 245-7

- 42 Milsom JW, Kim SH: **Laparoscopic versus open surgery for colorectal cancer.** World J Surg 1997 Sep;21(7):702-5
- 43 Rouffet F, Hay JM, Vacher B, Fingerhut A, Elhadad A, Flamant Y, Mathon C, Gainant A: **Curative resection for left colonic carcinoma: hemicolectomy vs. segmental colectomy. A prospective, controlled, multicenter trial.** Dis Colon Rectum 1994 Jul;37(7):651-9
- 44 Fong Y, Brennan MF, Turnbull A, Colt DG, Blumgart LH: **Gallbladder cancer discovered during laparoscopic surgery. Potential for iatrogenic tumor dissemination.** Arch Surg 1993 Sep;128(9):1054-6
- 45 Wade TP, Comitalo JB, Andrus CH, Goodwin MN Jr, Kaminski DL: **Laparoscopic cancer surgery. Lessons from gallbladder cancer.** Surg Endosc 1994 Jun;8(6):698-701
- 46 Jacobi CA, Keller H, Monig S, Said S: **Implantation metastasis of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopy.** Surg Endosc 1995 März;9(3):351-2
- 47 Cotlar AM, Mueller CR, Pettit JW, Schmidt ER, Villar HV: **Trocar site seeding of inapparent gallbladder carcinoma during laparoscopic cholecystectomy.** J Laparoendosc Surg 1996 Feb;6(1):35-45
- 48 Shirai Y, Ohtani T, Hatakeyama K: **Laparoscopic cholecystectomy may disseminate gallbladder carcinoma.** Hepatogastroenterology 1998 Jan-Feb;45(19):81-2
- 49 Z'graggen K, Birrer S, Maurer CA, Wehrli H, Klaiber C, Baer HU: **Incidence of port site recurrence after laparoscopic cholecystectomy for preoperatively unsuspected gallbladder carcinoma.** Surgery 1998 Nov;124(5):831-8
- 50 Reber PU, Baer HU, Patel AG, Schmied B, Buchler MW: **Port sites metastases following cholecystectomy for unsuspected carcinoma of the gallbladder.** Z Gastroenterol 1998 Okt; 36(10):901-7
- 51 Marmorale C, Scibe R, Siquini W, Massa M, Brunelli A, Landi E: **Parietal seeding of unsuspected gallbladder carcinoma after laparoscopic cholecystectomy.** Ann Ital Chir 1998 Sep-Okt;69(5):613-7
- 52 Johnstone PA, Rohde DC, Swartz SE, Fetter JE, Wexner SD: **Port site recurrences after laparoscopic and thoracoscopic procedures in malignancy.** J Clin Oncol 1996 Jun;14(6):1950-6
- 53 Nduka CC, Monson JR, Menzies-Gow N, Darzi A: **Abdominal wall metastases following laparoscopy.** Br J Surg 1994 Mai;81(5):648-52
- 54 Reymond MA, Schneider C, Hohenberger W, Kockerling F: **Pathogenesis of puncture-site metastases after laparoscopy.** Zentralblatt Chir 1997; 122(5):387-94

- 55 Schaeff B, Paolucci V, Thomopoulos J: **Port site recurrences after laparoscopic surgery. A review.** Dig Surg 1998;15(2):124-34
- 56 Martinez J, Targarona EM, Balague C, Pera M, Trias M: **Port site metastasis. An unresolved problem in laparoscopic surgery. A review.** Int Surg 1995 Okt-Dez;80(4):315-21
- 57 Thomas WM, Eaton MC, Hewett PJ: **A proposed model for the movement of cells within the abdominal cavity during CO2 insufflation and laparoscopy.** Aust N Z J Surg 1996 Feb;66(2):105-6
- 58 Jones DB, Guo LW, Reinhard MK, Soper NJ, Philpott GW, Connett J, Fleshman JW: **Impact of pneumoperitoneum on trocar site implantation of colon cancer in hamster model.** Dis Colon Rectum 1995 Nov;38(11):1182-8
- 59 Ishida H, Murata N, Yamada H, Nomura T, Shimomura K, Fujioka M, Idezuki Y: **Influence of trocar placement and CO(2) pneumoperitoneum on port site metastasis following laparoscopic tumor surgery.** Surg Endosc 2000 Feb;14(2):193-7
- 60 Mathew G, Watson DI, Rofe AM, Baigrie CF, Ellis T, Jamieson GG: **Wound metastases following laparoscopic and open surgery for abdominal cancer in a rat model.** Br J Surg 1996 Aug;83(8):1087-90
- 61 Targarona EM, Martinez J, Nadal A, Balague C, Cardesa A, Pascual S, Trias M: **Cancer dissemination during laparoscopic surgery: tubes, gas, and cells.** World J Surg 1998 Jan;22(1):55-60; Diskussion 60-1
- 62 Iwanaka T, Arya G, Ziegler MM: **Mechanism and prevention of port-site tumor recurrence after laparoscopy in a murine model.** J Pediatr Surg 1998 März;33(3):457-61
- 63 Balli JE, Franklin ME, Almeida JA, Glass JL, Diaz JA, Reymond M: **How to prevent port-site metastases in laparoscopic colorectal surgery.** Surg Endosc 2000 Nov;14(11):1034-6
- 64 Schneider C, Jung A, Reymond MA, Tannapfel A, Balli J, Franklin ME et al.: **Efficacy of surgical measures in preventing port-site recurrences in a porcine model.** Surg Endosc 2001 Feb;15(2):121-5
- 65 Ishida H, Murata N, Yamada H, Nakada H, Takeuchi I, Shimomura K et al.: **Pneumoperitoneum with carbon dioxide enhances liver metastases of cancer cells implanted into the portal vein in rabbits.** Surg Endosc 2000 März;14(3)239-42
- 66 Ishida H, Idezuki Y, Yokoyama M, Nakada H, Odaka A, Murata N et al.: **Liver metastasis following pneumoperitoneum with different gases in a mouse model.** Surg Endosc 2001 Feb;15(2):189-92
- 67 Ishida H; Hashimoto D; Nakada H; Takeuchi I; Hoshino T; Murata N; Idezuki Y; Hosono M: **Increased insufflation pressure enhances the development of liver**

- metastasis in a mouse laparoscopy model: possible mechanisms.** Surg Endosc 2002 Feb;16(2):331-5
- 68 Moreira H Jr, Yamaguchi T, Wexner S, Singer L, Zhao R, Biag MK et al.: **Effect of pneumoperitoneum on tumor dissemination and tumor recurrence at port-site and midline incisions.** Am Surg 2001 Apr;67(4):369-73
- 69 Wittich P, Steyerberg EW, Simons SH, Marquet RL, Bonjer HJ: **Intraperitoneal tumor growth is influenced by pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum.** Surg Endosc 2000 Sep;14(9):817-9
- 70 Mathew G, Watson DI, Rofe AM, Ellis T, Jamieson GG: **Adverse impact of pneumoperitoneum on intraperitoneal implantation and growth of tumour cell suspension in an experimental model.** Aust N Z J Surg 1997 Mai;67(5):289-92
- 71 Mathew G, Watson DI, Ellis T, De Young N, Rofe AM, Jamieson GG: **The effect of laparoscopy on the movement of tumor cells and metastasis to surgical wounds.** Surg Endosc 1997 Dec;11(12):1163-6
- 72 Watson DI, Mathew G, Ellis T, Baigrie CF, Rofe AM, Jamieson GG: **Gasless laparoscopy may reduce the risk of port-site metastases following laparoscopic tumor surgery.** Arch Surg 1997 Feb;132(2):166-8; Diskussion 169
- 73 Wittich P, Marquet RL, Kazemier G, Bonjer HJ: **Port-site metastases after CO(2) laparoscopy. Is aerosolization of tumor cells a pivotal factor?** Surg Endosc 2000 Feb;14(2):189-92
- 74 Neuhaus SJ, Texler M, Hewett PJ, Watson DI: **Port-site metastases following laparoscopic surgery.** Br J Surg 1998 Jun;85(6):735-41
- 75 Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Rowland R, Rofe AM, Pike GK, Mathew G, Jamieson GG: **Wound metastasis after laparoscopy with different insufflation gases.** Surgery 1998 Mai;123(5):579-83
- 76 Cavina E, Goletti O, Molea N, Bucciante P, Chiarugi M, Boni G, Lazzeri E, Bianchi R: **Trocar site tumor recurrences. May pneumoperitoneum be responsible?** Surg Endosc 1998 Nov;12(11):1294-6
- 77 Buchmann P, Christen D, Moll C, Flury R, Sartoretti C: **Tumor cells in peritoneal irrigation fluid in conventional and laparoscopic surgery for colorectal carcinoma.** Swiss Surg 1996;Suppl 4:45-9
- 78 Paik PS, Misawa T, Chiang M, Towson J, Im S, Ortega A, Beart RW Jr: **Abdominal incision tumor implantation following pneumoperitoneum laparoscopic procedure vs. standard open incision in a syngeneic rat model.** Dis Colon Rectum 1998 Apr;41(4):419-22
- 79 Kim SH, Milsom JW, Gramlich TL, Toddy SM, Shore GI, Okuda J, Fazio VW: **Does laparoscopic vs. conventional surgery increase exfoliated cancer cells in**

- the peritoneal cavity during resection of colorectal cancer?** Dis Colon Rectum 1998 Aug;41(8):971-8
- 80 Lecuru F, Agostini A, Camatte S, Robin F, Aggerbeck M, Jaiss JP et al.: **Impact of pneumoperitoneum on visceral metastasis rate and survival. Results of two ovarian cancer models in rats.** BJOG 2001 Jul;108(7):733-7
- 81 Moreno EF, Nelson H, Carugno F, Hodge D, Mozes G, Thompson GB: **Effects of laparoscopy on tumor growth.** Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 2000 Okt;10(5):296-301
- 82 Tsivian A, Shtabsky A, Isaakov J, Gutman M, Sidi AA, Szold A: **The effect of pneumoperitoneum on tumor dissemination and scar implantation of intra-abdominal tumor cells.** J Urol 2000 Dez;164(6):2096-8
- 83 Ishida H, Murata N, Idezuki Y: **Increased insufflation pressure enhances the development of liver metastasis in a mouse laparoscopy model.** World J Surg 2001 Dez;25(12):1537-41
- 84 Tomita H, Marcello PW, Milsom JW, Gramlich TL, Fazio VW: **CO2 pneumoperitoneum does not enhance tumor growth and metastasis: study of a rat cecal wall inoculation model.** Dis Colon Rectum 2001 Sep;44(9):1297-301
- 85 Pauwels M; Lauwers P; Hendriks J; Hubens A; Eyskens E; Hubens G: **The effect of CO2-pneumoperitoneum on the growth of a solid colon carcinoma in rats.** Surg Endosc 1999 Okt;13(19):998-1000
- 86 Southall JC, Lee SW, Bessler M, Allendorf JD, Whelan RL: **The effect of peritoneal air exposure on postoperative tumor growth.** Surg Endosc 1998 Apr;12(4):348-50
- 87 Allendorf JD, Bessler M, Horvath KD, Marvin MR, Laird DA, Whelan RL: **Increased tumor establishment and growth after open vs laparoscopic bowel resection in mice.** Surg Endosc 1998 Aug;12(8):1035-8
- 88 Ramos JM, Gupta S, Anthone GJ, Ortega AE, Simons AJ, Beart RW Jr: **Laparoscopy and colon cancer. Is the port site at risk? A preliminary report.** Arch Surg 1994 Sep;129(9):897-9; Diskussion 900
- 89 Cuschieri A: **Laparoscopic management of cancer patients.** J R Coll Surg Edinb 1995 Feb;40(1):1-9
- 90 Cook TA, Dehn TC: **Port-site metastases in patients undergoing laparoscopy for gastrointestinal malignancy.** Br J Surg 1996 Okt;83(10):1419-20
- 91 Jacobi CA, Wildbrett P, Volk T, Müller JM: **Influence of different gases and intraperitoneal instillation of adherent or cytotoxic agents on peritoneal tumor cell growth and implantation with laparoscopic surgery in a rat model.** Surg Endosc 1999 Okt;13(10):1021-5

- 92 Takiguchi S, Matsuura N, Hamada Y, Taniguchi E, Sekimoto M, Tsujinaka M: **Influence of CO₂ pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth.** Surg Endosc 2000 Jan;14(1):41-4
- 93 Farrell TM, Metreveli RE, Johnson AB, Smith CD, Hunter JG: **Choice of insufflating gas influences on wound metastasis.** Surg Endosc 2000 Nov;14(11):1047-9
- 94 Ishida H, Murata N, Yamada H, Nomura T, Shimomura K, Fujioka M, Idezuki Y: **Effect of CO₂ pneumoperitoneum on growth of liver micrometastases in a rabbit model.** World J Surg 2000 Aug;24(8):1004-8
- 95 Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, Erceg J, Lorenz M: **Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases.** Br J Surg 2001 März;88(3):371-5
- 96 Nduka CC, Coates P, Capel M, Mansfield A, Darzi A: **Carbon dioxide pneumoperitoneum enhances postoperative tumour growth.** Br J Surg 1997; 84(Suppl 1):25
- 97 Redmond HP, Hofmann K, Shou J, Leon P, Kelly CJ, Daly JM: **Effects of laparotomy on systemic macrophage function.** Surgery 1992;111:647-55
- 98 Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Abel PD, Williamson RC, Thompson JN: **Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy.** Br J Surg 1996;83:347-8
- 99 Jackson PG, Evans SRT: **Intraperitoneal macrophages and tumor immunity: a review.** J Surg Oncol 2000 Okt;75(2):146-54
- 100 Hajri A, Mutter D, Wack S, Bastien C, Gury JF, Marescaux J, Aprahamian M: **Dual effect of laparoscopy on cell-mediated immunity.** Eur Surg Res 2000;32(5):261-6
- 101 Neuhaus SJ, Watson DJ, Ellis T, Rofe AM, Mathew G, Jamieson GG: **Influence of gases on intraperitoneal immunity during laparoscopy in tumor-bearing rats.** World J Surg 2000 Okt;24(10):1227-31
- 102 Chekan EG, Nataraj C, Clary EM, Hayward TZ, Brody FJ, Stamat JC et al.: **Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum.** Surg Endosc 1999 Nov;13(11):1135-8
- 103 Volz J, Köster S, Spacek Z, Paweletz N: **The influence of pneumoperitoneum used in laparoscopic surgery on an intraabdominal tumor growth.** Cancer 1999 Sep 1;86(5):770-4
- 104 West MA, Baker J, Bellingham J: **Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂.** J Surg Res 1996;63:269-74
- 105 Sampson LE, Chaplin DJ: **The influence of oxygen and carbon dioxide tension on the production of TNF-alpha by activated macrophages.** Br J Cancer 1996;27:133-5

- 106 Kopernik G, Avinoach E, Grossmann Y et al.: **The effect of a high partial pressure of carbon dioxide environment on metabolism and immune functions of human peritoneal cells - relevance to carbon dioxide pneumoperitoneum.** Am J Obstet Gynecol 1998;179:1503-10
- 107 Eyrard S, Falkenrodt A, Tassette V et al.: **Influence of CO2 pneumoperitoneum upon systemic and peritoneal cell mediated immunity.** Surg Endosc 1996;10:550
- 108 Puttick MI, Nduka C; Yong L, Darzi A: **Macrophage activation and anti-tumor cytotoxicity is impaired following exposure to a carbon dioxide pneumoperitoneum.** Surg Endosc 1998;12(Suppl):40
- 109 Yoshida T, Kobayashi E, Suminaga Y, Yamauchi H, Kai T, Toyama N et al.: **Hormone-cytokine response. Pneumoperitoneum vs abdominal wall-lifting in laparoscopic cholecystectomy.** Surg Endosc 1997 Sep;11(9):907-10
- 110 Chekan EG, Nataraj C, Clary EM, Hayward TZ, Brody FJ, Stamat JC et al.: **Intra-peritoneal immunity and pneumoperitoneum.** Surg Endosc 1999 Nov;13(11):1135-8
- 111 Puttick MI, Scott-Coombes DM, Dye J, Nduka CC, Menzies-Gow NM, Mansfield AO et al.: **Comparison of immunologic and physiologic effects of CO2 pneumoperitoneum at room and body temperatures.** SurgEndosc 1999;13:572-5
- 112 Bouvy ND, Giuffrida MC, Tseng LN, Steyerberg EW, Marquet RL, Jeekel H, Bonjer HJ: **Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum, air pneumoperitoneum, and gasless laparoscopy on body weight and tumor growth.** Arch Surg 1998 Jun;133(6):652-6
- 113 Neuhaus SJ, Watson DI, Ellis T, Dodd T, Rofe AM, Jamieson GG: **Efficacy of cytotoxic agents for the prevention of laparoscopic port-site metastases.** Arch Surg 1998 Jul;133(7):762-6
- 114 Jacobi CA, Wenger FA, Ordemann J, Gutt C, Sabat R, Muller JM: **Experimental study of the effect of intra-abdominal pressure during laparoscopy on tumour growth and port site metastasis.** Br J Surg 1998 Okt;85(10):1419-22
- 115 De Jong KP, Brouwers MA, Huls GA, Dam A, Bun JC, Wubbena AS, Nieuwenhuis P, Sloof MJ: **Liver cell proliferation after partial hepatectomy in rats with liver metastases.** Anal Quant Cytol Histol 1998 Feb;20(1):59-68
- 116 Bergstrom M; Ivarsson ML; Holmdahl L: **Peritoneal response to pneumoperitoneum and laparoscopic surgery.** Br J Surg 2002 Nov;89(11):1465-9
- 117 Romeo C; Impellizzeri P; Antonuccio P; Turiaco N; Cifala S; Gentile C; Passaniti M; Marini H; Squadrito F; Altavilla D: **Peritoneal macrophage activity after laparoscopy or laparotomy.** J Pediatr Surg 2003 Jan;38(1):97-101; discussion 97-101

- 118 Yavuz Y; Ronning K; Lyng O; Gronbech JE; Marvik R: **Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on tissue blood flow in the peritoneum, rectus abdominis, and diaphragm muscles** Surg Endosc 2003 Oct;17(10):1632-5
- 119 Larsen JF; Ejstrup P; Svendsen F; Pedersen V; Redke F: **Systemic response in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy using gasless or carbon dioxide pneumoperitoneum: a randomized study.** J Gastrointest Surg 2002 Jul-Aug;6(4):582-6
- 120 Clary EM; Bruch SM; Lau CL; Ali A; Chekan EG; Garcia-Oria MJ; Eubanks S: **Effects of pneumoperitoneum on hemodynamic and systemic immunologic responses to peritonitis in pigs.** J Surg Res 2002 Nov;108(1):32-8
- 121 Uemura N; Nomura M; Inoue S; Endo J; Kishi S; Saito K; Ito S; Nakaya Y: **Changes in hemodynamics and autonomic nervous activity in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy: differences between the pneumoperitoneum and abdominal wall-lifting method.** Endoscopy 2002 Aug;34(8):643-50
- 122 Jacobi CA; Sabat R; Bohm B; Zieren HU; Volk HD; Muller JM: **Pneumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells.** Surgery 1997 Jan;121(1):72-8
- 123 Robinson J Paul (Hrsg.): **Handbook of flow cytometry methods.** New York: Wiley-Liss 1993
- 124 Bryson GJ, Harmon BV, Collins RJ: **A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment.** Immunol Cell Biol 1994 Feb;72(1):35-41
- 125 Steinkamp JA, Lehnert BE, Lehnert NM: **Discrimination of damaged/dead cells by propidium iodide uptake in immunofluorescently labeled populations analyzed by phase-sensitive flow cytometry.** J Immunol Methods 1999 Jun24;226(1-2):59-70
- 126 Shih SC, Stutman O: **Cell cycle-dependent tumor necrosis factor apoptosis.** Cancer Res 1996 Apr 1;56(7):1591-8
- 127 Struikmans H, Rutgers DH, Jansen GH, Tulleken CA, van der Tweel I, Battermann JJ: **S-phase fraction, 5-bromo-2'-deoxy-uridine labelling index, duration of S-phase, potential doubling time, and DNA index in benign and malignant brain tumors.** Radiat Oncol Investig 1997;5(4):170-9
- 128 Torricelli A, Bisiach M, Spinelli L, Ubezio P: **From flow cytometric BrdUrd data to cell population growth and doubling time.** Cytometry 1997 Nov 1;29(3):222-32
- 129 Kitagawa T, Matsumoto K, Iriyama K, Suzuki H: **Prognostic significance of the bromodeoxyuridine labeling index in primary colorectal carcinoma.** Surg Today 1997;27(7):613-6

- 130 Ortiz H, Armendariz P, Yarnoz C: **Early postoperative feeding after elective colorectal surgery is not a benefit unique to laparoscopy-assisted procedures.** Int J Colorectal Dis 1996;11(5):246-9
- 131 Grace PA, Quereshi A, Coleman J, Keane R, McEntee G, Broe P et al.: **Reduced postoperative hospitalization after laparoscopic cholecystectomy.** BrJSurg 1991; 78:160-2
- 132 Rosell Pradas J, Astruc Hoffmann A, Ruiz de Adana A, Vara Thorbeck R: **Minimally aggressive surgery in advanced cancer of the colon.** Rev Esp Enferm Dig 1993 Jun;83(6):429-33
- 133 Nari G, Moreno E, Agostino R, D'Alessandro M, ;Lopez Vinuesa F: **Laparoscopic surgery without pneumoperitoneum.** Rev Esp Enferm Dig 1998 März;90(3): 155-61

6. ANHANG

6.1 *Material*

6.1.1 Chemikalien

6.1.1.1 ZELLKULTIVIERUNG

RPMI 1640

Gibco BRL, Kat. Nr. 21875-034

Fötales Kälberserum

Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert

Gibco BRL, Kat. Nr. 10108-157

HEPES Puffer

Gibco BRL, Kat. Nr. 15630-056

6.1.1.2 TRYPSINIEREN UND ZÄHLEN

PBS Spülpuffer

PBS mit Calcium und Magnesium

Gibco BRL, Kat. Nr. 14040-091

PBS ohne Calcium und Magnesium

Gibco BRL, Kat. Nr. 14190-094

Trypsin

Trypsin-EDTA

Pan Systems GmbH, Kat. Nr. P10-023100

Trypan-Blau

Sigma, Kat. Nr. T-8154

6.1.1.3 FÜR ALLE VERSUCHE

Kohlendioxid zur Insufflation

Medizinische Kohlensäure, Messer Griesheim

6.1.1.4 NEKROSE-FÄRBUNG

Propidium-Iodid

$C_{27}H_{34}N_4I_2$, 10 mg/ml

Sigma München, Kat. Nr. P 4170

6.1.1.5 QUANTITATIVE DNA-BESTIMMUNG

TRIS-Puffer

500 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium)

1,2114 g Tris-HCl

0,3722g Na-EDTA

Cystein-Puffer

500 ml PBS (ohne Calcium und Magnesium)

0,439 g Cystein-HCl

0,930 g Na-EDTA

PICO Green

text

Papain

(1:200 im Cystein-Puffer)

6.1.2 Einwegmaterialien

Kulturgefäße

Flaschen mit 12,5 cm² und 25 cm² Bodenfläche (Falcon Primaria; Art. Nr.)

Zentrifugenröhrchen

Zentrifugengefäße zu 25 ml und 50 ml Inhalt (Falcon Primaria; Art. Nr.)

FACS-Röhrchen

Röhrchen für die Analyse von Zellsuspensionen im Durchflußzytometer mit einem Volumen von 2 ml ()

Kryo-Röhrchen

Verschließbare Röhrchen für die Kryokonservierung von Zellsuspensionen mit einem Volumen von 2 ml (Nunc; Art. Nr.)

Pipetten

Sterile Pipetten für Volumina von 1, 5, 10 und 25 ml (Falcon Primaria; Art. Nr.)

6.1.3 Zelllinien (gemäß In-vitro-Tumorsteckbrief DKFZ Heidelberg)

Kolon-Karzinom CX-2

Name: CX-2
Histologischer Typ: Adenokarzinom
Herkunft: human

Wachstum und Subkultivierung

Kultivierung: Monolayer
Subkulturintervall: 4-5 Tage
Populationsverdopplung: ca. 25 Stunden
Züchtungsmedium: RPMI 1640 90%, FKS 10%

Kryokonservierung und Duplikatsicherung

Ampullenvolumen: 2 ml
Zellzahl pro Milliliter: 2 Millionen
Gefrierschutzmittel: DMSO 10%

Herkunft des Primärtumors

Spezies: Human
Organ: Kolon
Herkunft: NCI, USA
Etabliert: In-vitro etabliert H. Lörke 1985
Histologische Klassifikation: Wenig differenziertes Adenokarzinom des Kolon

Pankreas-Karzinom DAN-G

Name: DAN-G
Histologischer Typ: Karzinom
Herkunft: human

Wachstum und Subkultivierung

Kultivierung: Monolayer

Subkulturintervall: 3-5 Tage
Populationsverdopplung: ca. 31 Stunden
Züchtungsmedium: RPMI 1640 90%, FKS 10%

Kryokonservierung und Duplikatsicherung

Ampullenvolumen: 2 ml
Zellzahl pro Milliliter: 2 Millionen
Gefrierschutzmittel: DMSO 10%

Herkunft des Primärtumors

Spezies: Human
Organ: Pankreas
Herkunft: NCI, USA
Etabliert: In-vitro etabliert H. Lührke 1985
Histologische Klassifikation: Pankreaskarzinom

6.2 Arbeitstechniken

6.2.1 Splitten und Weiterkultivieren von Zellen

1. Medium aus der Kulturflasche abgießen
2. Zellen mit 10 ml PBS Spülpuffer (ohne Calcium und Magnesium) spülen
3. PBS abgießen und 5 ml Trypsin zugeben
4. Zellen mit dem Trypsin 5 min im Brutschrank inkubieren
5. Anschließend Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösen
6. Die Suspension mit 5 ml Medium auffüllen und in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführen
7. Über 5 min bei 1.400 U/min zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
8. Resuspendieren des Sediments mit 5 ml Medium
9. Verteilen der Suspension auf die neuen Kulturflaschen (Anzahl nach Bedarf)
10. Auffüllen der Suspensionen mit Medium auf 10 ml je Flasche

6.2.2 Einfrieren von Zellen

1. Einige Stunden zuvor alle für die Verarbeitung benötigten Materialien im -20°C -Kühlschrank vorkühlen. Einfriereröhrchen müssen im -80° -Kühlschrank vorgekühlt worden sein. Ab Schritt 7. werden auf 4°C gekühlte Lösungen verwendet
2. Medium aus der Kulturflasche abgießen
3. Zellen mit 10 ml PBS Spülpuffer (warm; ohne Calcium und Magnesium) spülen
4. PBS abgießen und 5 ml warmes Trypsin zugeben
5. Zellen mit dem Trypsin 5 min im Brutschrank inkubieren
6. Anschließend die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösen
7. Die Suspension mit 5 ml Medium auffüllen und in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführen

8. Über 5 min bei 1.400 U/min in der Kühlzentrifuge bei 4° C zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
9. Das Sediment mit 1,0 ml DMSO resuspendieren.
10. Überführen der Suspension in ein 1,8-ml-Einfrierröhrchen
11. Zwischenlagern der Suspension im –80°C-Kühlschrank für drei Tage
12. Abschließend endgültige Lagerung im flüssigen Stickstoff

6.2.3 Bestimmung der Zellkonzentration

1. Medium aus der Kulturflasche abgießen
2. Zellen mit 10 ml PBS Spülpuffer (ohne Calcium und Magnesium) spülen
3. PBS abgießen und 5 ml Trypsin zugeben
4. Zellen mit dem Trypsin 5 min im Brutschrank inkubieren
5. Anschließend Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösen
6. Die Suspension mit 5 ml Medium auffüllen und in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführen
7. Über 5 min bei 1.400 U/min zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
8. Resuspendieren des Sediments mit 1 ml Medium
9. Von der Suspension 10 µl entnehmen und mit 90 µl Trypanblau gründlich mischen
10. Von dieser Suspension 10 µl entnehmen und auf die vorbereitete NEUBAUER-Zählkammer geben.
11. Quadrantenweises Auszählen der Zellen in der Zählkammer
12. Ermittlung der Zellkonzentration in der 1-Milliliter-Suspension: Ein Zehntel der durchschnittlichen Zellzahl aus allen vier Quadranten entspricht der Konzentration in Millionen Zellen pro Milliliter

6.2.4 Behandlung von Zellen mit Kohlendioxid

1. Vor CO₂-Exposition Mediumwechsel in den Kulturgefäßen mit den zu behandelnden Zellen und den Zellen der Kontrollgruppe
2. Einsetzen der Kulturgefäße in die Insufflationskästen. Verschließen des Deckels
3. Einsetzen der Insufflationskästen in den Inkubator (Raumluft, T = 37° C)
4. Anschließen des Insufflators an den Einlaßstutzen des Insufflationskastens. Auslaßstutzen offen lassen. Ableitung des CO₂ in die Umgebung außerhalb des Inkubators
5. Einsetzen der Kontrollgruppen-Zellen in den Inkubator (außerhalb der Boxen)
6. Durchfluten der Box mit 15 l CO₂ bei einer Flußrate von 15 l * min⁻¹ (Auslaß offen)
7. Anschließend Einstellen des gewünschten Druckes am Insufflator
8. Auslaß schließen und Zellen für vier Stunden mit CO₂ behandeln
9. Nach vier Stunden Stoppen der Exposition. Mediumwechsel wie in Schritt (1)
10. Weiteres Verarbeiten der Zellen entsprechend dem Untersuchungsziel

6.2.5 Zellzählung in der NEUBAUER-Zählkammer

1. Medium aus der Kulturflasche abgießen
2. Zellen mit 10 Milliliter PBS Spülpuffer (ohne Calcium und Magnesium) spülen
3. PBS abgießen und 5 ml Trypsin zugeben
4. Zellen mit dem Trypsin 5 min im Brutschrank inkubieren
5. Anschließend Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösen
6. Die Suspension mit 5 ml Medium auffüllen und in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführen
7. Über 5 min bei 1.400 U/min zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
8. Sediment mit 1 ml Medium resuspendieren
9. Von der Suspension 10 µl entnehmen und mit 90 µl Trypanblau gründlich mischen
10. 10 µl der Suspension entnehmen und auf die Neubauer-Zählkammer geben
11. Bestimmen der Zellkonzentration der 1-ml-Suspension:
Jeden Quadranten einzeln auszählen und den Durchschnitt aus der Summe aller Zellen in den Quadranten bilden. Division des Betrages durch 10 ergibt die Zellkonzentration in Millionen pro ml. Anschließend wird die Ursprungssuspension standardmäßig um das fehlende Volumen mit Medium auf die Standardkonzentration von $1 \cdot 10^6$ /ml aufgefüllt und dient als Ausgangssuspension für weitere Verdünnungen

6.2.6 Nekrosefärbung mit Propidium-Iodid

1. Zellen in der Kulturflasche nach Anleitung 1 spülen und abtrypsinieren. Gemäß Anleitung 3 die Zellkonzentration der 1-ml-Suspension bestimmen
2. 12,5 cm²-Kulturflaschen vorbereiten: Pro Ansatz und Gruppe jeweils sechs Flaschen. Insgesamt drei Gruppen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und mit Propidium-Iodid gefärbte Zellen. Insgesamt fünf Ansätze: zwei Ansätze mit unbehandelten Zellen als Positiv- und Negativkontrollen und Zellen unter CO₂ bei null, 6 und 12 mmHg
3. Nach 24 h Exposition der Zellen der CO₂-Ansätze nach Anleitung 4
4. Spülen der Zellen jeder Gruppe mit 5 ml PBS Spülpuffer und Trypsinieren mit 5 ml Trypsin-EDTA über 5 min bei 37° C im Inkubator
5. Auffüllen der Suspensionen mit 5 ml Medium und Zentrifugieren der Zellen über 5 min bei 1.400 U/min. Anschließend Abgießen des Überstandes
6. Resuspendieren der Sedimente mit Medium auf Konzentrationen von etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter
7. Inkubieren der Zellen der Positiv-Kontrolle mit 5 ml Formalin 10% bei Raumtemperatur zum vollständigen Abtöten der Zellen
8. Nach zehn Minuten alle Proben gründlich suspendieren. Von allen Proben Entnahme von je 100 µl und Inkubation der Probenteile mit Propidium-Iodid für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4°C
9. Nach der Inkubation Verdünnen der Proben mit jeweils 400 µl FACS-Puffer
10. Abschließend Messen im Durchflußzytometer

6.2.7 Quantitative DNA-Bestimmung mit Pico Green

1. Spülen, Abtrypsinieren und Bestimmung der Zellkonzentration gemäß Anleitung 3.
2. Herstellen von Verdünnungsreihen mit Konzentrationen von $1,0 \cdot 10^5$ und $2,0 \cdot 10^4$ Zellen pro Milliliter
3. Ein Suspensionsvolumen von 50 μ l entspricht einer Zellzahl von 5.000 bzw. 1.000
4. Zellen nach Erfordernis auf 96-Loch-Platten ausbringen
5. Im Falle einer Exposition unter verschiedenen Drücken procedere gemäß Anleitung 4
6. Unmittelbar nach der Exposition und dann jeden Tag Mediumwechsel in allen Löchern aller Platten
7. An den für die Messung vorgesehenen Tagen die Zellen wie folgt behandeln
8. Zellen in den jeweiligen Löchern mit Vollmedium dreimal spülen
9. Zum Aufbewahren die Zellen durch Fönen trocknen und bei Raumtemperatur trocken lagern; ansonsten gleich weiterverarbeiten wie im nächsten Schritt
10. Papain mit Cysteinpuffer auf 1:200 verdünnen
11. 100 μ l der Papainlösung in jedes Loch geben und 24 h bei 60° C inkubieren. Es ist darauf zu achten, daß die Platten während der Inkubation in einer feuchten Kammer luftdicht verschlossen sind
12. Nach 24 h die Pico-Green-Stammlösung aus -20° C auftauen
13. Die Stammlösung in TRIS/EDTA [2x] auflösen
14. 100 μ l der so hergestellten Lösung in jedes Loch geben
15. Die Zellen 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
16. Messung im Cytofluor bei B/B 3 (ex = 485 nm; em = 520 nm)

6.2.8 Standardkurve Zellzahl/Fluoreszenz

1. Spülen und Abtrypsinieren der Zellen und Konzentrationsbestimmung gemäß Anleitung 3
2. Auffüllen der Suspension mit Medium auf die Standardzellkonzentration von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter
3. 96-Loch-Platten vorbereiten: Je eine Platte für jede Zelllinie; identische Zellzahlen in jeder der Spalten einer Platte; ansteigende Zellzahlen mit steigender Spaltennummer (#1 - #12: Spaltennummern; nt: Zellzahl pro Loch in Tausend)

#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
5t	10t	15t	20t	25t	30t	40t	50t	60t	70t	80t	90t

4. Zellen bis zur vollständigen Adhärenz am Boden der einzelnen Löcher für 24 Stunden ruhen lassen. Nach 24 h lichtmikroskopische Kontrolle der Adhärenz
5. Andauen und Färben der Zellen nach der Pico-Green-Methode (Anleitung 8, Schritte 8-15)
6. Abschließend Messung im Cytofluor bei B/B 3 (ex = 485 nm; em = 520 nm)

6.2.9 Plateaubestimmung

1. Medium aus der Kulturflasche abgießen
2. Zellen mit 10 ml PBS Spülpuffer ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) spülen
3. PBS abgießen und 5 ml Trypsin zugeben
4. Zellen mit dem Trypsin 5 min im Brutschrank inkubieren
5. Anschließend Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösen
6. Die Suspension mit 5 ml Medium auffüllen und in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführen
7. Über 5 min bei 1.400 U/min zentrifugieren und anschließend Überstand abgießen
8. Das Sediment mit 1 ml Medium resuspendieren
9. Von der Suspension 10 µl entnehmen und mit 90 µl Trypanblau gründlich mischen
10. 10 µl der Suspension entnehmen und auf die Neubauer-Zählkammer geben
11. Bestimmen der Zellkonzentration der 1-ml-Suspension
12. Die Suspension mit Medium bis auf $c = 1,0 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter auffüllen
13. Verdünnungsreihen herstellen: $1,0 \cdot 10^5$ /ml (für 5.000 Zellen entspr. 50 µl) sowie $2,0 \cdot 10^4$ /ml (für 1.000 Zellen entspr. 50 µl)
14. 96-Loch-Platten beschicken: pro Zelllinie eine Platte für Zellzahl 5.000 pro Loch sowie eine Platte für Zellzahl 1.000 pro Loch; jeweils eine Spalte pro Tag; Meßzeitpunkte: Tage 1 bis 9 für die 5.000-Zell-Ansätze sowie die Tage 5 bis 20 für die 1.000-Zell-Ansätze
15. An den angegebenen Tagen die DNA-Fluoreszenz mit der Pico-Green-Methode bestimmen (Anleitung 8, Schritte 8-15)
16. Abschließend Messung im Cytofluor bei B/B 3 (ex = 485 nm; em = 520 nm)

6.2.10 Azidometrie des Nährmediums

1. Befüllen von insgesamt 20 75-cm²-Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Nährmedium
2. Aufteilen der Flaschen in vier Gruppen: Kontrolle, 0 mmHg, 6 mmHg und 12 mmHg
3. Einsetzen der CO₂-Gruppen in die Insufflationskästen und Verschließen der Kästen
4. Einsetzen der Kästen in den Wärmeschrank und Anschließen an den Insufflator. Die Kontrollgruppen-Flaschen bleiben im Wärmeschrank außerhalb der Kästen
5. Durchspülen der Kästen mit 15 l Kohlendioxid über die Dauer einer Minute bei offenem Auslaß
6. Verschließen des Auslasses und Einstellen des gewünschten Druckes für die hyperbaren Gruppen. Beim isobaren Versuch bleibt der Auslaß offen
7. Stündliches Erneuern des verbrauchten Gases bis zur vierten Expositionsstunde gemäß Anleitung 4
8. Nach vier Stunden Ablassen des Kohlendioxids und Abgießen des Mediums in zuvor beschriftete Bechergläser
9. Messung der einzelnen pH-Werte in den vier Gruppen mit dem pH-Meter

Danksagung

Ein Studium ohne Dissertation abzuschließen ist kein Problem, eine Dissertation ohne Studium abzufassen jedoch unmöglich. Und so gebührt mein größter Dank zuallererst meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Auch meine – gerade in Zeiten examensbedingter Belastungen – bisweilen aufgetretenen Unleidlich- bis hin zu Unausstehlichkeiten zu ertragen, dürfte ihnen und auch dem Rest meiner Familie nicht immer leichtgefallen sein. Diese oft und erfolgreich abgefangen zu haben, ist das ehrenvolle Verdienst all der studentischen und nichtstudentischen Freunde und Bekannten, die hier alle namentlich zu erwähnen den Rahmen sicher sprengen würde. Es dürfte jedoch jeder von ihnen wissen, wer sich hier angesprochen fühlen darf.

Mir ist kein Fall bekannt, wo eine wissenschaftliche Arbeit ohne Rückschläge, Fehlschläge und Frustrationen bewältigt worden wäre. Und so danke ich hier vor allen anderen meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gutt für die konsequente Betreuung meiner Dissertation, angefangen von der Formulierung der Fragestellung über die Hilfestellung bei der Abfassung wissenschaftlicher Artikel bis hin zur letztlichen Vollendung meiner Arbeit. Ganz besonders dankbar bin ich ihnen dafür, daß sie es mir ermöglicht haben, meine Ergebnisse auf dem Zweiten Workshop für experimentelle laparoskopische Chirurgie in Rotterdam vorzustellen – ein Ereignis, das mir nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht in Erinnerung bleiben wird. Nicht minder groß ist jedoch der Dank, den ich den Mitarbeitern des Wissenschaftlichen Labors des Zentrums der Chirurgie an der Frankfurter Universitätsklinik schulde. Sie vollbrachten das Wunder, daß ich auch an manch arbeitsreichen Sonntagen, die ich bisweilen von sehr früh morgens bis sehr spät abends im Labor zugebracht habe, noch Vergnügen gefunden habe. Besondere Erwähnung verdienen hier die Leiterin des Labors, Frau Schröder, und Frau Elsie Oppermann. Keines meiner Probleme war ihnen zu gering, als daß sie es nicht für wert befunden hätten, sich seiner anzunehmen und mich mit Geduld und Sachverstand zu einer Lösung zu führen.

Mein letzter Dank gilt nun zum Schluß noch meiner Schwester Karin, die es – als fachfremde Germanistin – auf sich genommen hat, all die sich unweigerlich einschleichenden sprachlichen, orthographischen und grammatikalischen Holperigkeiten aufzuspüren und auszumerzen.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Die Proliferation humaner Karzinomzellen unter dem Einfluß eines
In-vitro-Pneumoperitoneums

im Zentrum der Chirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Priv-Doz. Dr. med. C. Gutt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, 3.3.2008

Thorsten Bruttel

Durchdeich 145
21037 Hamburg

Lebenslauf

Name	Thorsten Bruttel
Geburt	7.8.1970 in Neustadt an der Weinstraße
Familienstand	Ledig
Schulausbildung	
1977 – 1991	Grundschule
1981 – 1990	Staatliches Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt an der Weinstraße
Mai 1990	Abitur
Wehrdienst	
Juni 1990 – August 1990	Akademie des Sanitätswesens der Bundeswehr, München
September 1990 – August 1991	Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz
Studium	
April 1992 – März 1998	Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main
April 1998 – März 1999	Praktisches Jahr an den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main/Höchst
August 1996 – September 2002	Dissertation: „Das Verhalten humaner Karzinomzellen unter dem Einfluß eines In-vitro-Pneumopertoneums“
Examina	
8.9.1994	Ärztliche Vorprüfung
29.8.1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24.3.1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.5.1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Berufliche Tätigkeit	
1.9.1999 – 28.2.2001	AiP in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße, Bremen
März 2001 – Juni 2006	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum Bremen-Mitte
seit Juni 2006	Facharzt für Anästhesiologie