

Marcus Alexander Burkhardt
Dr. med.

Nachweis der induzierbaren Stickstoffmonoxid - Synthase in Lebergewebe mittels nicht - radioaktiver *in situ* - Hybridisierung und Immunhistochemie.

Geboren am 30.08.1969 in Kirchheim unter Teck
Reifeprüfung am 11.05.1989 in Nürtingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis SS 1997
Physikum am 01.04.1993 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heilbronn
Staatsexamen am 11.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. L. Theilmann

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator des Immunsystems. Die Synthese von NO, einem einfachen Radikal mit vielfältigen Funktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen, stellt einen unspezifischen Mechanismus der Immunantwort dar. Es existieren zwei Isoenzyme, die NO synthetisieren, indem sie L-Arginin in L-Citrullin umwandeln. Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) läßt sich nach Stimulation mit LPS und Zytokinen in verschiedenen Zellen nachweisen. Diese Zellen, v.a. Makrophagen, setzen unter dem Einfluß von Zytokinen NO in sehr hohen Konzentrationen frei. Indem es mit Superoxidanionen zu dem stark toxischen Peroxynitrit reagiert, kann NO einen unspezifischen toxischen Effekt ausüben. Andererseits hat NO auch eine Schutzfunktion. In einem Sepsis-Modell an Ratten wirkt die Stimulation von iNOS hepatoprotektiv.

Die Rolle von NO bei akuten und chronischen Lebererkrankungen ist unklar. Deshalb war es das Ziel der Arbeit die Funktion von iNOS in Lebergewebe mit chronischer Infektion, Reinfektion nach Lebertransplantation (LTX) und Rejektion nach LTX zu untersuchen.

Es wurden zwei verschiedene Methoden etabliert. Zum einen die *in situ*-Hybridisierung, die den Nachweis der iNOS-mRNA ermöglicht und zum anderen die Immunhistochemie, mit der sich das Protein iNOS darstellen läßt. Untersucht wurden Gefrierleberschnitte von 89 Patienten. Für die *in situ*-Hybridisierung wurde nach Paraformaldehyd-Fixierung des Lebergewebes eine ca. 200 bp lange, Digoxigenin-markierte Sonde verwendet. Die Immunhistochemie wurde nach Fixierung des Lebergewebes mit 70% Ethanol mit Hilfe monoklonaler iNOS-Antikörper durchgeführt. Nach Optimierung verschiedener Protokollparameter gelang die spezifische und sensitive Darstellung der iNOS-mRNA sowie der iNOS.

Sowohl in Hepatozyten als auch in Entzündungszellen wurde iNOS-mRNA und iNOS nachgewiesen. Bei chronischer viraler Hepatitis war eine große Anzahl von Hepatozyten positiv für iNOS-mRNA bzw. für iNOS. Doch bei einer Hepatitis B oder C Reinfektion nach Lebertransplantation zeigte sich sowohl in der *in situ*-Hybridisierung als auch in der Immunhistochemie der stärkste Nachweis von iNOS-mRNA bzw. iNOS. Häufig war die Anfärbung in der Nachbarschaft von entzündlich infiltrierten Gewebsanteilen verstärkt. Jedoch war bei akuter oder chronischer Rejektion nach Lebertransplantation die Anzahl der iNOS-mRNA- bzw. iNOS-positiven Hepatozyten und deren Färbeintensität deutlich geringer als bei viraler Hepatitis oder Reinfektion. In Kontroll-

Leberschnitten ohne pathologischen Befund war die Häufigkeit von iNOS-mRNA- bzw. iNOS-positiven Zellen ähnlich der in Lebergewebe mit Rejektion. Doch zeigte sich bei Rejektion eine deutliche Signalgebung in den intralobulären Makrophagen-ähnlichen Zellen (Kupffer-Zellen).

Die Versuche zeigen, daß bei einer Reinfektion die Synthese von NO in Hepatozyten und Entzündungszellen in stärkerem Maße erhöht ist als bei einer Rejektion. Doch scheint die NO-Synthese in den intralobulären Makrophagen-ähnlichen Zellen nur bei Rejektion nachweisbar zu sein. Eventuell handelt es sich hierbei um einen pathophysiologischen Mechanismus der Abstoßung.