

## Der Einfluß von Komplement auf die Zytotoxizität von *Entamoeba histolytica*

H. Stemberger\*, H. Kollaritsch\*, G. Wiedermann\* und J. Meingassner\*\*

\* = Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

\*\* = Sandoz-Forschungsinstitut Wien

In einer früheren Arbeit (1) haben wir in vitro die Effekte der Produkte des Immunsystems auf Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* (Stamm HK-9) in einem Chromfreisetzungstest untersucht. Dabei zeigte sich, daß Antikörper allein keine über die Spontanlyse hinausgehende Chromfreisetzung aus Trophozoiten bewirkten. Auch die Kombination von Antikörpern und Normalhumanlymphozyten im Sinne einer 'antibody-dependent cellular cytotoxicity' (ADCC) (2) erwies sich als in vitro Effektormechanismus zur Lyse von Trophozoiten als ineffektiv. Wurde frisches komplementhaltiges Normalhumanserum radioaktiv markierten Trophozoiten zugesetzt, so führte dies zu einer signifikanten Lyse dieser Zellen. Der Zusatz eines dekomplementierten antikörperhaltigen Patientenserums konnte die durch Komplement allein bedingte Lyse nicht weiter steigern. Diese Versuchsreihe zeigte, daß antikörperabhängige zytolytische Immuneffektorsysteme bei Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* wirkungslos bleiben.

Einen deutlich amöbiciden Effekt wiesen die Lymphozyten eines Patienten mit Amöbenleberabszeß auf.

In weiteren Untersuchungen (3) beschäftigten wir uns mit der Interaktion von Amöben mit Komplement, wobei wir feststellen konnten, daß zwischen der eingesetzten Komplementmenge und dem Ausmaß der Lyse von *Entamoeba histolytica* eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung bestand, und daß die Dekomplementierung des eingesetzten Normalhumanserums durch Hitze oder durch Zymosan die amöbicide Wirkung aufheben konnte. Weiters zeigte sich, daß Trophozoiten von Kulturamöben einen sehr starken komplementverbrauchenden Effekt besitzen. Untersuchten wir den Komplementverbrauch durch verschiedene Stämme von Kulturamöben, so zeigte sich, daß zur Konsumption von 10 Komplementeinheiten zwischen 300 und 10.000 Trophozoiten eingesetzt werden müssen.

Es fand sich allerdings keine Korrelation zwischen dem Komplementkonsumptionsverhalten und der Pathogenität der getesteten Stämme gemessen an der Pathogenität im Hamster. Da sich der Komplementverbrauch durch die Trophozoiten aller getesteten Stämme nicht durch Füllen der Magnesiumionen, wohl aber durch Füllen von Magnesium- und Calciumionen verhindern ließ, konnte geschlossen werden, daß die Komplementspaltung unter Umgehung der frühen Komplementkomponenten zustande kam, also auf dem sogenannten alternate pathway, ein Befund, der durch HULDT und Mitarbeiter (4) bestätigt wurde. Eine vergleichende Analyse von C-3 in der gekreuzten Immunelektrophorese (5) nach einer Inkubation mit Trophozoiten bei 0° und 37°C zeigt, daß im 37°-Ansatz das native C-3 weitestgehend in  $\beta_1A$  umgewandelt wurde, was beweist, daß die Komplementaktivierung durch Amöben mit der Konversion von C-3 beginnt. Bei all unseren Untersuchungen fiel auf, daß im Vergleich zum starken Komplementverbrauch durch die Trophozoiten der amöbicide Effekt durch Komplement gering war und nie einen Wert von 50 % überschritt.

Im Chromfreisetzungstest können lediglich amöbicide Funktionen von Immuneffektorsystemen erfaßt werden, die nur im positiven Fall eine Aussage über deren protektiven Wert erlauben. Es wäre aber durchaus vorstellbar, daß Produkte des Immunsystems Funktionsstörungen an den Trophozoiten verursachen, die nicht zum Austritt zytoplasmatischer Bestandteile führen und trotzdem eine Behinderung zytotoxischer Effekte von Trophozoiten auf Wirtszellen zur Folge haben. Aus diesem Grund etablierten wir ein in-vitro Modell, bei welchem die Trophozoiten von Kulturamöben die Funktion von Effektorzellen, Gewebekulturzellen humanen Ursprungs die von Zielzellen haben. An diesem Modell konnten wir zeigen, daß Komplement eine sehr viel stärkere Hemmwirkung auf Trophozoiten entfaltet, als dies auf Grund seines amöbiciden Effektes zu erwarten gewesen wäre.

### **Material und Methodik:**

#### *Amöben:*

Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* des Stammes SFL-3 wurden in TPS-1-Medium monoxenisch mit Kritidien (AC-Kultur) gehalten, wobei 72-Stunden-Kulturen im Zytotoxizitätstest eingesetzt wurden. Die Kulturröhrchen wurden 10 Minuten lang ins Eisbad gestellt, bei 200 g 10 Minuten lang zentrifugiert und 3x in auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Amöben in einer Zählkammer gezählt und die erforderliche Amöbendichte in Barbitalpuffer eingestellt.

#### *Zielzellen:*

Als Zielzellen verwendeten wir K562, eine humane erythroide Leukämiezelle, welche in RPMI 1640, welches 10% fetales Kälberserum enthielt, kultiviert worden war. 48-Stunden-Kulturen wurden nach der Methode von Larson (5) mit  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  markiert, gezählt und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen in RPMI 1640 + 10% fetales Kälberserum eingestellt.

#### *Zytotoxizitätstest:*

200  $\mu\text{l}$  der Zielzellensuspension ( $5 \times 10^4$  K562-Zellen pro Milliliter) wurden mit 200  $\mu\text{l}$  der Suspension von Trophozoiten sowie 200  $\mu\text{l}$  Barbitalpuffer in Plastikröhrchen (3x27 mm) gefüllt, die Zellen je nach Versuchsansatz entweder suspendiert oder 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und anschließend im 37°C Brutschrank 90 Minuten inkubiert.

Im Anschluß daran wurden die Zellen erneut suspendiert, um so eine gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität zu gewährleisten; dann wurde 15 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der halbe Überstand in ein neues Röhrchen transferiert, und die Radioaktivität in einem Gamma-Zähler (Packard 2.000) gemessen. Die Chromfreisetzung und damit die aufgetretene Lyse der Zielzellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Chromfreisetzung} = \frac{2\ddot{U}}{\ddot{U} + B} \times 100$$

$\ddot{U}$  = Radioaktivität im Überstand, B = Radioaktivität im Bodensatz.

In allen jenen Experimenten, in denen Normalhumanserum als Komplementquelle eingesetzt wurde, kam dieses in einer Menge von 0,2 ml anstelle der 0,2 ml Barbitalpuffer zum Einsatz.

## Ergebnisse und Diskussion:

In Abbildung 1 ist ein typisches Experiment dargestellt, bei welchem zu einer konstanten Zahl von Zielzellen unterschiedliche Mengen von Trophozoiten zugesetzt wurde. Es zeigt sich, daß in einem Bereich einer Effektor-Zielzellen-Relation von 10 : 1 und 5 : 1 eine deutliche zytotoxische Aktion beobachtet wurde. Erst bei einem Verhältnis Amöben : Zielzellen von 1 : 1 konnte keine spezifische Lyse mehr nachgewiesen werden.

In einem Kontrollversuch mit *Entamoeba invadens* konnte auch bei einem Verhältnis von 10 Amöben auf 1 Zielzelle keine über die spontane Chromfreisetzung hinausgehende Lyse beobachtet werden.

Wurden vor der Inkubation die Effektor- und Targetzellen durch Zentrifugation pelletiert, so zeigte sich, daß die Lyse weiter zu steigern war. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse eines solchen Versuches wiedergegeben, wobei eine suboptimale Effektor-Zielzellen-Ratio von 5 : 1 zum Einsatz kam. Unter diesen Versuchsbedingungen war im pelletierten Ansatz eine Lyse von ca. 65 % aufgetreten, waren die Zellen in Suspension gehalten, betrug die Lyse nur knapp über 20%.

Dieser Versuch zeigt, daß der Lysemechanismus von *Entamoeba histolytica* gegenüber dieser Gewebekulturzellen eines Zell-zu-Zell-Kontaktes bedarf. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Ravdin et al. (6), die in cinematographischen Studien zeigen konnten, daß nur solche Zielzellen lysiert wurden, welche einen direkten Kontakt mit *Entamoeba histolytica* hatten. Dabei spielt offensichtlich die Phagozytose von Zielzellen nur eine untergeordnete Rolle, über 94% der Zielzellen werden noch bevor sie phagozytiert werden, lysiert.

Der Einfluß von Komplement auf die zytotoxische Aktion von *Entamoeba histolytica* gegenüber den K562-Zellen ist in Abbildung 2 dargestellt: In diesem Versuch kamen 0,1 ml eines Normalhumanserums zum Einsatz, welches 25 CH<sub>50</sub> pro ml enthielt. Dabei zeigte sich, daß diese Komplementmenge ausreicht, um die zytolytische Aktivität der Amöben vollständig zu unterdrücken. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Ergebnissen aus unseren früheren Untersuchungen über die amöbicide Wirkung von Komplement, so fällt auf, daß die Hemmung der zytotoxischen Effekte von *Entamoeba histolytica* auf Zielzellen weitaus stärker ausfällt, als dies auf Grund des amöbiciden Effektes von Komplement zu erwarten wäre. Es zeigt sich somit, daß mit Hilfe dieses Zytotoxizitätstests Funktionsstörungen von *Entamoeba histolytica* erfaßt werden können, auch wenn diese nicht zum Austritt von zytoplasmatischen Substanzen geführt haben.

TABELLE 1:

Stamm:	% Lyse:
SFL3 + K502 pelletiert	65,5 ± 1,2
SFL3 + K562 in Suspension	18,4 ± 0,8

ABBILDUNG 1

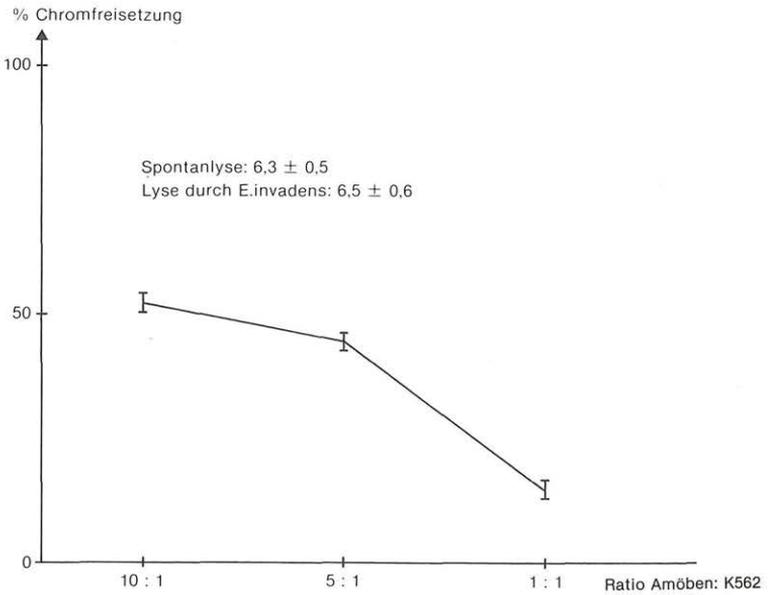
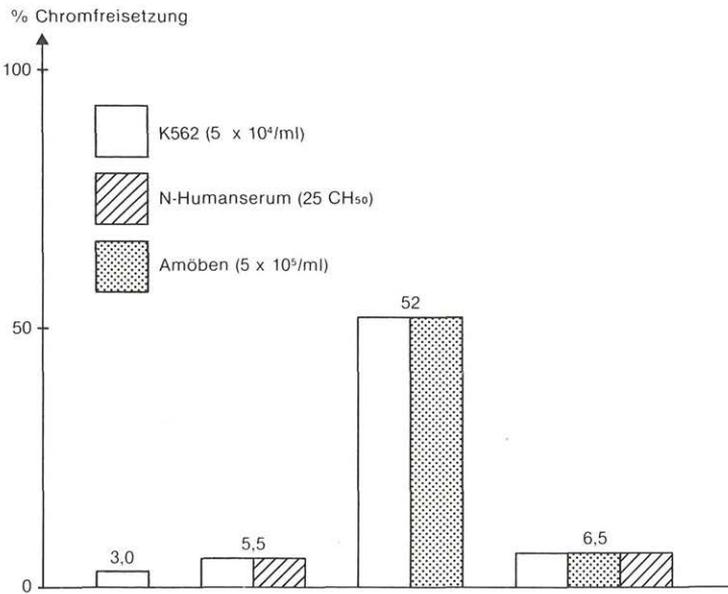


ABBILDUNG 2



## Literatur

1. STEMBERGER, H.: Zytolytische Immunreaktionen in vitro gegen Trophozoiten von *E.histolytica*.  
Immunität und Infektion 6, 71 (1978).
2. STEMBERGER, H., SCHEINER, O., WIEDERMANN, G., KRAFT, D.: Activities of Benzylpenicilloyl  $\gamma$ 6bpo7-specific IgM versus IgG fractions in the antibody dependent cellular cytotoxicity.  
Zschr.f.Imm.Forsch. 153, 358 (1977).
3. STEMBERGER, H., WIEDERMANN, G., MEINGASSNER, J.: Intraction of *E.histolytica* with human complement.  
Z.Imm.Do 156, 240 (1979).
4. HULDT, G., DAVIES, P., ALLISON, A.C., SCHORLEHNER, M.U.: Interaction between *Entamoeba histolytica* and complement. Nature 277, 214 (1979).
5. LARSSON, A., PISARRI-SALSANO, S., ÖHLANDER, C., NATVIG, J.B., PERLMAN, P.:  
Destruction of dextran-coated target cells by normal human lymphocytes.  
Scand.J.Immunol. 4, 421 (1975).
6. RAVDIN, J.J., CROFT, B.Y., GUERRANT, R.L.: Cytopathogenic Mechanismus of *Entamoeba histolytica*.  
J.Exp.Med. 152, 377 (1980).

### KORRESPONDENZADRESSE:

Univ. Doz. Dr. Heinrich Stemberger  
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin  
der Universität Wien  
Kinderspitalgasse 15, A-1095 Wien

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1982

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Stemberger Heinrich, Kollaritsch Herwig,  
Wiedermann Gerhard, Meingassner Josef G.

Artikel/Article: [Der Einfluß von Komplement auf die Zytotoxizität von Entamoeba Histolytica 59-63](#)