

Die zytotoxische Wirksamkeit von *Entamoeba histolytica* auf Gewebekulturzellen

H. Stemberger¹, H. Hudler¹, O. Scheiner², H. Kollaritsch¹ und G. Wiedermann¹

1 = Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin der Universität Wien

2 = Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Wien

Einleitung

Die Pathogenese der Amöbiasis ist in vielen Punkten unklar. Insbesondere gibt es bis heute keine Erklärung, warum nur ein kleiner Prozentsatz der mit *E. histolytica* infizierten Personen klinische Symptome im Sinne einer akuten Amöbenruhr, einer chronischen Amöbencolitis oder eines Amöbenabszesses entwickeln. Die in der Literatur postulierten Begriffe wie "parasite factor" und "host factor" (6) tragen zwar im Moment zum Verständnis der Pathogenese nichts bei, weisen aber auf die Wege hin, die bei der Erforschung der Pathomechanismen der Amöbiasis beschritten werden:

1. Bezüglich des "host factors": Suche nach wirksamen spezifischen und unspezifischen Effektormechanismen, die der Eliminierung der Infektion dienen könnten oder zumindest die zytotoxischen Effekte der Amöben zu behindern imstande sind. Es wurde gezeigt, daß sowohl Lymphozyten von Patienten nach invasiver Amöbiasis (6, 7) als auch Normalhumankomplement (5, 6, 7, 8, 9) in der Lage sind, Trophozoyten von *E. histolytica* irreversibel zu schädigen, währenddessen spezifische Antikörper wie auch Komplement eine vorübergehende Blockade der Amöbenoberfläche (10) und eine Behinderung der zytotoxischen Wirkung der Amöben bewirken (5).
2. Bezüglich des "parasite factors": Etablierung von *in vitro*-Systemen, mit deren Hilfe eine unterschiedliche Zytopathogenität verschiedener Amöbenstämme zu erfassen sind. Die meisten Autoren ziehen zu diesem Zweck den zytopathogenen Effekt (CPE) von ganzen, lebenden Amöben sowie von Amöbenextrakten oder Fraktionen davon auf Monolayer-Gewebekulturzellen heran (11, 12, 13, 14, 15, 16). Auch lectinartige Wirkungen von Amöbenextrakten wurden beschrieben (17, 18, 12), die offensichtlich eine Bindung zwischen Amöben und Zielzellen vermitteln. McCaul beschrieb 1977 erstmals die Verwendung von ⁵¹Cr-markierten Gewebekulturzellen bei der Erforschung der Zytopathogenität der *E. histolytica* (19).

In der vorliegenden Arbeit wird ein einfaches *in vitro*-Testsystem zur schnellen Erfassung der zytotoxischen Effekte von *E. histolytica* auf Gewebekulturzellen vorgestellt. Mit Hilfe dieses Systems war es uns möglich, einige Vorstellungen über den Mechanismus der zellschädigenden Wirkung von *E. histolytica* zu entwickeln.

Material und Methodik

Amöben:

Für alle Tests wurden Kulturamöben des Stammes SFL3 in monoxenischer AC-(Amöben-Crithidien)-Kultur verwendet. Die Crithidien wurden in TP-SB- oder TTY-SB-Medium (1, 2), die Amöben im TYI-S-33-Medium (3) kultiviert.

Die Amöben wurden für alle Tests 72 Stunden nach dem Überimpfen geerntet. Zu diesem Zeitpunkt sind keine, die Versuche störenden Crithidien mehr vorhanden. Die Trophozoiten wurden 3x in RPMI 1640, supplementiert mit 10% fetalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (RPMI/FCS) gewaschen, gezählt und je nach Effektor-zu-Zielzell-Ratio (E/T-R, Verhältnis von Amöben zu Zielzellen) auf die Konzentration von 5×10^5 - $0,625 \times 10^4$ Zellen/ml RPMI/FCS eingestellt.

Zielzellen:

Als Zielzellen verwendeten wir K562-Gewebekulturzellen, welche in RPMI/FCS in Suspension kultiviert wurden.

In den Versuchen wurden ausnahmslos Zielzellen eingesetzt, die 72 Stunden nach dem Umsetzen geerntet worden waren.

Markierung der Zielzellen:

Eine Suspension von K562 ($2,5 \times 10^6$ Zellen) wurden zentrifugiert (600xg, 5 Minuten), der Überstand quantitativ abgehoben und das Pellet mit 200 Ci $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr -Natriumchromat, Hoechst-Austria) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x in RPMI/FCS gewaschen; nach dem letzten Waschen wurde die Viabilität der Zielzellen mit Trypanblau getestet (sie lag stets über 95%); die Zellen wurden dann auf eine endgültige Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. 0,2 ml dieser Zellsuspension wiesen eine Aktivität von 2.000 bis 7.000 cpm auf.

Komplement:

Als Komplementquelle diente frisches, in allen amöbenspezifischen Serotests negatives normales Humanserum mit einem Komplementgehalt von 20 CH₅₀, welches je nach Versuchsansatz konzentriert oder in RPMI/FCS verdünnt eingesetzt wurde.

Versuchsansatz:

In Mikrozytotoxizitätsröhrchen (7 x 50 mm, Fa. Greiner) wurden 200 µl der Suspension markierter K562, 200 µl RPMI/FCS oder Normalhumanserum und 200 µl der Amöbensuspension pipettiert; anschließend wurde der Ansatz entweder sofort zentrifugiert (2 Minuten bei 600 x g) und in zentrifugiertem Zustand inkubiert oder in einem Overheadmixer während der gesamten Inkubationszeit in Suspension gehalten.

Die Inkubationszeit variierte je nach Versuch von 10 Minuten bis maximal 5 Stunden. Anschließend an die Inkubation wurde der Röhrcheninhalt, wenn er nicht in Suspension war, resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der freigesetzten Radioaktivität zu erreichen, und sofort 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert.

Von jedem Röhrchen wurden danach der halbe Überstand (300 µl) in ein neues Röhrchen transferiert, und die Radioaktivität in beiden Röhrchen (1/2 Überstand, sowie Bodensatz + halber Überstand) ermittelt. Der Prozentsatz der ^{51}Cr -Freisetzung in den Überstand wurde als Maß für die Zell-Lyse herangezogen und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{2 \times \ddot{U}}{\ddot{U} + B} \times 100 = \% \text{ } ^{51}\text{Cr-Fr.}$$

\ddot{U} = 300 µl Überstand, B = 300 µl Überstand + Bodensatz.

Alle Versuche wurden in Dreifachansätzen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit 0,2 ml radioaktiv markierten Zielzellen und 0,4 ml RPMI/FCS ohne Effektorzellen unter sonst identischen Bedingungen mitgeführt (Spontan-Lyse).

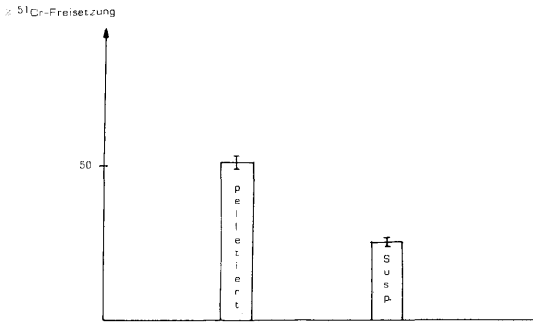


Abb. 1: Vergleich der zytolytischen Wirkung von SFL9 auf K562.
SFL3 : K562 = 5:1 IKZ: 3+ min. bei 37°C

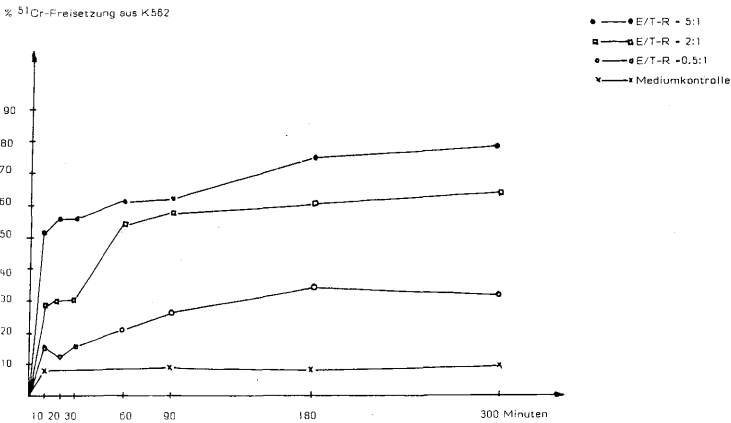


Abb. 2: Kinetik der zytotox. Wirkung von Amöben auf K562 im pelletierten Ansatz, bei einer Effektor-Target-Zell-Ratio (E/T-R) von 5:1, 2:1 und 0.5:1.

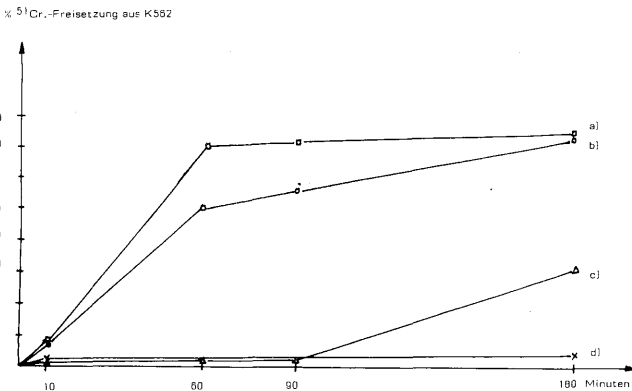


Abb. 3: Einfluß von Komplement auf die Zytotoxizität von *E. histolytica*, wenn es dem Versuchsansatz zu verschiedenen Zeiten zugegeben wurde: a) ohne Komplement, b) Komplementzugabe nach 10 Minuten, c) a) Vorinkubation der Amöben mit Komplement. x d) Mediumkontrolle ohne Amöben.

Ergebnisse und Diskussion

Ein Vergleich der ^{51}Cr -Freisetzung von zwei Versuchsansätzen in einer E/T-R von 5 : 1, wobei das eine Mal Amöben mit Zellen durch Zentrifugation pelletiert, das andere Mal die Zellen in Suspension gehalten wurden, zeigte, daß im pelletierten Ansatz nach einer halben Stunde die Lyse der Zielzellen etwa doppelt so hoch lag wie in dem Ansatz, in dem Effektor- und Zielzellen in Suspension gehalten worden waren (Abb. 1).

Dieses Ergebnis zeigt, daß der Zellschaden je nach Intensität des Kontaktes der Zielzelle mit *E.histolytica* gesetzt wird. Darüber hinaus versuchten wir in einem Transferexperiment zu überprüfen, ob auch ein löslicher zytotoxischer Mediator zusätzlich wirksam wird. Zu diesem Zweck inkubierten wir in einem Pellet-Ansatz (Zusammenzentrifugieren Amöben und Zielzellen) Trophozoiten mit Zielzellen in einer E/T-R von 5 : 1 60 Minuten bei 37°C, resuspendierten die Amöben und Zielzellen kurz, um eine gleichmäßige Verteilung eines eventuell gebildeten Zytotoxins zu erreichen, zentrifugierten anschließend erneut ab und transferierten 0,1 ml des Überstandes zu 0,2 ml einer Suspension von radioaktiv markierten K562 ($5 \times 10^4/\text{ml}$). Auch dieser Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert, und im Anschluß daran die ^{51}Cr -Freisetzung in den Überstand gemessen. Dabei zeigte sich, daß unter diesen Versuchsbedingungen keine lösliche zytotoxische Substanz nachgewiesen werden konnte, da der Transfer des Überstandes auf frische Zielzellen keine zytotoxische Wirkung im Sinne der ^{51}Cr -Freisetzung ausübte. Es wäre denkbar, daß der gewählte experimentelle Ansatz zu wenig empfindlich ist, um diesen hypothetischen Mediator nachzuweisen. Versuche, diese Frage abzuklären, sind im Gange.

Um Vergleichswerte für unsere weiteren Versuche bezüglich Wirksamkeit von Antikörpern und Komplement auf die zytotoxische Aktion von *Entamoeba histolytica* auf Gewebekulturzellen zu erhalten und unser Zytotoxizitäts-Testsystem genauer zu studieren, untersuchten wir die zytotoxische Aktion von *Entamoeba histolytica* auf K562-Zellen in einer Zeitstudie.

In Abbildung 2 ist in einem Diagramm das Ausmaß der ^{51}Cr -Freisetzung zwischen 10 Minuten und 300 Minuten bei verschiedenen Mengenverhältnissen von Amöben und Zielzellen dargestellt. Es zeigte sich, daß bereits nach 10 Minuten etwa die Hälfte, bei einer Effektor-Targetzell-Ratio von 5 : 1 sogar 2/3 der maximal erreichbaren Lyse eingetreten ist. Spätestens nach 60 Minuten wird dann ein Plateau der ^{51}Cr -Freisetzung erreicht.

Dieser Kurvenverlauf sowie die Tatsache, daß das maximal erreichbare Ausmaß der ^{51}Cr -Freisetzung der E/T-R und damit der Wahrscheinlichkeit des Kontaktes einer Zielzelle mit einer Amöbe im Sediment entspricht, läßt den Schluß zu, daß der Zielzellschaden unmittelbar nach dem Kontakt mit den Trophozoiten auftritt, und für den weiteren Fortgang der Chromfreisetzung möglicherweise die Anwesenheit von Amöben nicht mehr nötig ist.

Um diese Annahme zu erhärten, setzten wir konzentriertes Normalhumenserum als Komplementquelle ein, um selektiv, das heißt, ohne Zerstörung der Zielzellen, die zytotoxische Aktion von *E.histolytica* zu unterbinden (5, 8).

In Abbildung 3 ist die Kinetik der Lyse von K562 durch Trophozoiten von SFL bei einer E/T-R von 5 : 1 dargestellt. Kurve a) zeigt die Kinetik ohne Beeinflussung von Komplement. Wurden die Amöben mit Komplement 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert, so zeigte sich, daß die zytotoxische Aktivität von Amöben 90 Minuten lang vollständig unterbunden war (Kurve c). Inkubierten wir Amöben und Zielzellen 10 Minuten lang bei Raumtem-

peratur oder 37°C im pelletierten Zustand und setzten die Amöben erst dann der Komplementwirkung aus, so zeigte sich (Kurve b), daß durch diese Maßnahme die ⁵¹Cr-Freisetzung aus Zielzellen nicht mehr zu verhindern war. Dieser Versuch liefert somit einen Hinweis, daß die Lyse von K562 durch Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* in 2 Phasen abläuft: In der ersten Phase, die man als "Angriffsphase" bezeichnen könnte, und die innerhalb der ersten 10 Minuten abgeschlossen zu sein scheint, wird durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt eine biochemisch noch nicht definierte zytotoxische Substanz übertragen, die offensichtlich nicht in nachweisbaren Mengen in die entferntere Umgebung abgegeben wird. Denkbar wäre die Anheftung von sogenannten "oberflächenaktiven Lysosomen" an die Zielzelle, die dann in der 2. Phase, die allem Anschein nach von der Anwesenheit zytolytisch aktiver Amöben unabhängig verläuft, lytisch wirksame Enzyme an der Oberfläche der Zielzellen freisetzt. Solche oberflächenaktive Lysosomen wurden von EATON et al beschrieben (4).

McCAUL (19) beschrieb auch eine Hemmung der Zytotoxizität der Amöben durch Phospholipasehemmer.

Wenn auch die Wichtigkeit des direkten Kontaktes zwischen Amöbe und Zielzelle hinlänglich bekannt ist, so verblüfft doch der schnelle Eintritt der zytotoxischen Wirkung der Amöben. Weitere vorläufige Resultate weisen nun darauf hin, daß Amöbenstämme, die weniger pathogen sind als der von uns verwendete Stamm SFL3, einen wesentlich langsameren Anstieg der Zytotoxizität bewirken, was zur Beurteilung der Pathogenität eines Amöbenstammes herangezogen werden könnte; Untersuchungen darüber sind im Gange.

Zusammenfassung

Mit einem Chromfreisetzungstest wurde die zytotoxische Wirkung von Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* des Stammes SFL3 auf Gewebekulturzellen (K562) untersucht. In jenen Versuchen, in denen die Amöben mit den Zellen zusammen zentrifugiert worden waren, war die Lyse der Zellen signifikant höher als bei in Suspension gehaltenen Ansätzen. Das Ausmaß der durch die Amöben erreichbaren Chromfreisetzung war weiters abhängig vom Verhältnis Amöben zu Zielzellen (E/T-Ratio) und von der Inkubationszeit. Der sehr rasche Anstieg der Chromfreisetzung sowie die Beobachtung, daß die Lyse der Zielzellen nach nur 10 Minuten nicht mehr entscheidend verhindert werden konnte, zeigt die Wichtigkeit des direkten Kontaktes zwischen Amöben und Zielzellen für die zytotoxische Wirkung der *Entamoeba histolytica*.

Summary

The cytotoxic effect of *Entamoeba histolytica* (monoxenically cultured strain SFL3) on tissue culture cells (K562) was determined by a chromium release assay. Coculturing of amoeba with target cells in a pellet assay led to an isotope release which was significantly higher than in an assay in which the effector and target cells were being kept in suspension. Furthermore, target cell destruction by amoebae was increased with increasing effector/target cell ratio as well as with increasing time of incubation. The fast onset of target cell lysis by amoebae in a pellet assay as well as the impossibility to inhibit target cell destruction by selective complement mediated elimination of the amoebae 10 minutes after the start of the cytotoxic reaction strongly suggest, that target cell lysis is mediated by a contact dependent lethal hit.

Literatur:

- 1) DIAMOND, L.S. (1968): Improved Method for the Monoxenic Cultivation of *E.histolytica* Schaudinn, 1903 and *E.histolytica*-like amoebae with Trypanosomatids. *J. Parasitol* 54, 715—719.
- 2) DIAMOND, L.S. (1968): Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*-like amoebae. *J. Parasitol* 54, 1074.
- 3) DIAMOND, L.S. (1980): A new medium for the axenic cultivation of *E.histolytica* and other *Entamoebae*. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 72, 431—432.
- 4) EATON et al. (1976): Correspondence: A surface active Lysosome in *E.histolytica*. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 63, 678.
- 5) HUDLER et al.: Antagonistischer Effekt vo Antikörpern und Komplement auf die zytotoxische Aktivität von *E.histolytica*. *Mitt. d. ÖGTP* 1982, im Druck.
- 6) MARTINEZ-PALOMO, A. (1982): *The Biology of Entamoeba histolytica*. *Res.Stud.Press*, John Wiley a. sons. Ltd.
- 7) STEMBERGER, H. (1978): Zytolytische Immunreaktionen in vitro gegen Trophozoiten von *E. histolytica*. *Imm. u. Inf.* 6, 71—78.
- 8) HULDT, G. et al. (1979): Interaction between *E.histolytica* and Complement. *Nature* 277, 214—216.
- 9) GHADIRIAN et al. (1982): Effect of Complement Depletion on Hepatic Amoebiasis in Hamsters. *Clin.Imm.Immunopath.* 24, 315—319.
- 10) BIAGI, F.F. et al. (1966): Remobilisation of *Entamoeba histolytica* after exposure to immobilizing antibodies. *Exp.Paras.* 18, 87.
- 11) LUSHBAUGH, W. et al. (1979): Isolation of a Cytotoxin-Enterotoxin from *E.histolytica*. *J.Inf.Dis.* 139, 9—17.
- 12) KOBILER et al. (1981): Lectin and Toxin-like activities of *E. histolytica*: A comparison of Properties. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 30 (5), 955—959.
- 13) MATTERN et al. (1980): *Entamoeba histolytica* "Toxin": Fetuin neutralizable and lectin-like. *Am.J.trop.Med.Hyg.* 29 (1), 26—30.
- 14) RAVDIN et al. (1980): A Cytopathogenic mechanisms of *E.histolytica*. *J.Exp.Med.* 152, 377—390.
- 15) KNOGHT (1977): An in vitro Model for Measuring the Cytopathic Effect of *E. histolytica*. *J. Parasitol* 63, 388—389.
- 16) MATTERN et al. (1978): Experimental Amoebiasis: III. A rapid in vitro Assay for Virulence of *E.histolytica*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 27 (5), 882—887.
- 17) KOBILER, D. et al. (1981): Adhesion of *Entamoeba histolytica* Trophozoites to Monolayers of Human Cells. *J.Inf.Dis.* 144, 539—546.
- 18) KOBILER, D. et al. (1980): Lectin Activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Inf.u.Imm.* 29 (1), 221—225.
- 19) Mc.CAUL et al. (1977): *E.histolytica* and *E.invadens*: Chromium Release from Labelled Human Liver Cells in Culture. *Exp.Parasit.* 43, 342—352.

KORRESPONDENZADRESSE:

Univ. Doz. Dr. Heinrich Stemberger
Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin
der Universität Wien
A-1090 Wien, Kinderspitalgasse 15

ZOBODAT - 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: 1983

Band/Volume: [5](#)

Autor(en)/Author(s): Stemberger Heinrich, Hudler Helmut, Scheiner O., Kollaritsch Herwig, Wiedermann Gerhard

Artikel/Article: [Die zytotoxische Wirksamkeit von Entamoeba Histolytica auf Gewebekulturzellen. 29-34](#)