

Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 8 (1986) 291–297

Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene (Vostand: Prof. Dr. W. Bommer) der Universität Göttingen

In-vitro-Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von *Plasmodium falciparum* in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowie unter L-DOPA-Einfluß

Gudrun Mansouri, R. Kaminsky, Claudia Huppach

Einleitung

Eine natürliche vererbte Resistenz gegen Malariaplasmodien wird – wenigstens bis zu einem gewissen Grade – bei Personen mit Sichelzellanämie, G6PD-Mangel oder Thalassaemie seit längerem vermutet. Der hierfür verantwortliche Resistenzmechanismus beruht offenbar auf einem multifaktoriellen Geschehen. Membran-Eigenschaften, Erythrozytenverformbarkeit, Oxidationsstreß, Eisenstoffwechsel, vermehrter Erythrozytenabbau, Filtermechanismus der Milz, Glutathion-Reduktion seien als einige dieser Faktoren angeführt (ALLISON 1961; LUZATTO 1974; NURSE 1979; FRIEDMANN und TRAGER 1979, 1981; PASVOL und WILSON 1982; POLLAK 1983; GOLENSER et al. 1983).

Die verminderte oder fehlende Synthese der β -Kette des Hämoglobins kennzeichnet die β -Thalassaemie, welche bei den homozygoten Trägern unbehandelt infolge der schweren Anämie früh zum Tode führt, bei heterozygoten Personen jedoch keine klinischen Symptome hervorruft (FAIRBANKS 1980; WHO-Working Group 1982). Die geographische Korrelation zwischen Endemiegebieten der Malaria und dem β -Thalassaemie-Gen hat zu der Vermutung geführt, daß Personen, welche dieses Gen tragen, eine Art natürlichen Schutzes gegen die Malariainfektionen besitzen (FRIEDMANN 1983; WILLCOX et al. 1983).

Seitdem die erfolgreiche in-vitro-Kultivierung von *Plasmodium falciparum* gelungen ist (TRAGER und JENSEN 1976), können die zellulären Grundlagen der vererbten Resistenzen gegenüber Malaria untersucht werden.

Die nachfolgend dargestellten Untersuchungen befassen sich mit der Frage, in welcher Weise das Wachstumsverhalten von Malariaplasmodien in normalen und in β -Thalassaemie-Erythrozyten durch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen sowie durch Behandlung mit 3,4- β -Hydroxyphenylalanin (L-DOPA) beeinflusst wird.

Material und Methoden

Die Kultivierung des bei unseren Untersuchungen verwendeten *Plasmodium*-Stammes [FCB (*Falciparum* Columbia Bogota) von den Behringwerken, Marburg] wurde mit Hilfe der von TRAGER und JENSEN (1978) beschriebenen Kerzentopf (candle jar)-Methode vorgenommen mit der Abwandlung, daß dem Kulturmedium (RPMI 1640) 15% Humanserum beigegeben wurde.

Spender für heterozygote β -Thalassaemie-Erythrozyten waren Eltern von homozygoten Patienten der Univ.-Kinderklinik in Göttingen. Jeweils zum selben Zeitpunkt wurden blutgruppengleiche Kontroll-Erythrozyten von gesunden Spendern gewonnen.

Die in-vitro-Kultivierung wurde mit einem Hämatokrit von 3–5% und einer Anfangsparasitämie von 0,5%–1% – bei einigen Versuchen auch bis zu 4% – begonnen. Zweimal täglich wurde das Medium gewechselt. Zur Infektion der Erythrozyten verwendeten wir mit Sorbitol synchronisierte Kulturen (Ringformen) nach der Methode von LAMBROS und VANDERBERG (1979). Der Grad der Parasitämie sowie der prozentuale Anteil an Ringstadien, Trophozoiten und Schizonten wurden anhand von 1.000 ausgezählten Erythrozyten nach Giemsa gefärbten Ausstrichen bestimmt.

Für die Versuche mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (3%, 7%, 12%, 17%, 22%, 30%) verwendeten wir Prüfgasgemische mit einer konstanten CO_2 -Konzentration von 5% und Stickstoff. Die Plasmodien wurden in einer „Modular Incubatur Chamber“ der Fa. Billips Rothenberg 5 Tage kultiviert und nach jedem Mediumwechsel 3–5 Minuten lang begast. Für die Versuche mit L-DOPA (3,4- β -Hydroxyphenylalanin) wurden Konzentrationen von 1, 2 und 5 mmol/l in PBS (Phosphatpuffer) (pH 7,0) sowie in Kulturmedium hergestellt.

Die normalen roten Blutkörperchen sowie die β -Thalassaemie-Erythrozyten von heterozygoten Trägern wurden in je vier Proben unterteilt, von denen je zwei sofort, die übrigen jedoch erst nach Behandlung mit L-DOPA infiziert wurden. Die Behandlung der Erythrozyten mit L-DOPA erfolgte in einem geschlossenen Reagenzglas (PBS/DOPA + Medium/DOPA) über 30 Minuten bei 37° C. Anschließend wurde 5 Minuten lang bei 1.800 U/min. zentrifugiert, der Oberstand dekantiert, mit frisch angesetztem Medium 5-fach aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Dann erfolgte die Infektion mit *Plasmodium falciparum* (Parasitämie 0,5–1%).

In einer zweiten Versuchsreihe wurden infizierte Erythrozyten vier Tage kultiviert und dann derselben Prozedur unterworfen. Parallel zu beiden Versuchsreihen wurden je zwei Kontrollen angesetzt, die nur mit PBS bzw. mit Medium ohne DOPA-Zusatz beschickt wurden.

Ergebnisse

Versuche mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Versuche mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen wurden in einer ersten Versuchsreihe an frisch entnommenen Erythrozyten durchgeführt, in einer zweiten an Blutkörperchen, die bei +4° C zwei Wochen lang gelagert hatten. In der ersten Versuchsreihe zeigten die heterozygoten β -Thalassaemie-Erythrozyten bei Sauerstoffkonzentrationen zwischen 7% und 30% keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Wachstums der Malariaplasmodien in den normalen Erythrozyten. Bei einer O_2 -Konzentration von 3% fiel die Parasitämie in beiden Erythrozytenarten rapide ab; nach 5 Tagen war das Plasmodienwachstum in den β -Thalassaemie-Erythrozyten vollständig gehemmt. In den normalen Blutkörperchen wurden die Plasmodien zwar auch größtenteils pyknotisch, doch erholten sich einzelne Ringformen wieder, so daß eine konstante Parasitämie von 1–2% erhalten blieb. Bei beiden Erythrozytenarten erwies sich das Plasmodiumwachstum bei 17% O_2 -Konzentration als optimal (Abb. 1 a, b).

In der zweiten Versuchsreihe mit zwei Wochen alten Erythrozyten zeigte sich eine generell auffällig reduzierte Plasmodieninvasion. Sauerstoffkonzentrationen von 3% und 30% hatten hier eine absolut letale Wirkung, so daß nach 5-tägiger Kultivierung

nur noch pyknotische Reste von Plasmodien übrigblieben. Eine 22%ige O₂-Konzentration erwies sich sowohl für normale als auch für β-Thalassaemie-Erythrozyten als die günstigste (Abb. 2 a, b).

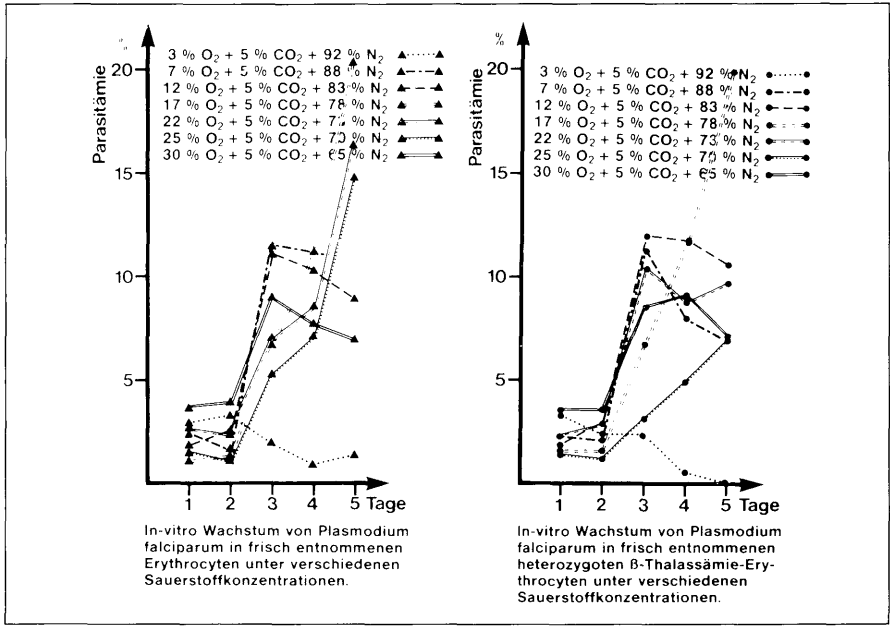


Abb. 1 a und 1 b

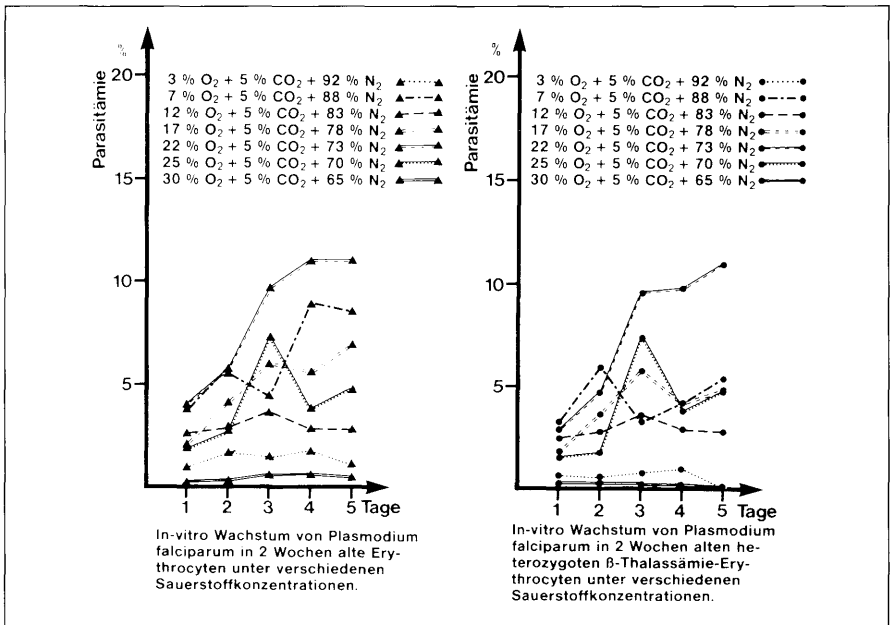


Abb. 2 a und 2 b

Versuche mit L-DOPA

Eine Behandlung der mit Plasmodien (Ringstadien) infizierten Erythrozyten am 1. Tag mit L-DOPA hatte in den ersten sieben Tagen keinen letalen Effekt auf die Parasiten bei den angewendeten L-DOPA-Konzentrationen (Abb. 3). Auch ergab sich in den Kontrollen, daß weder der Phosphatpuffer noch die übrige Prozedur der Behandlung negativ auf das Wachstum einwirkten. Deutlich zeigte sich wieder das von KAMINSKY et al. (1984) bereits früher beobachtete reduzierte Wachstum der Plasmodien in β -Thalassaemie-Erythrozyten spätestens nach dem 5. Tag der Kultivierung.

Anders waren die Ergebnisse, wenn eine synchronisierte Kultur, welche nur die späten Trophoziten- und Schizontenstadien enthielt, am 4. Tag der Kultivierung mit 5 mmol L-DOPA/l behandelt wurde: Diese Konzentration vermochte das Plasmodienwachstum sowohl in den β -Thalassaemie-Erythrozyten als auch in den normalen roten Blutkörperchen nach zwei weiteren Zyklen vollständig zu hemmen. Niedrigere Konzentrationen (1 oder 2 mmol/l) zeigten noch keine hemmende Wirkung auf das Parasitenwachstum (Abb. 3). Es war kein Unterschied festzustellen, ob der DOPA-Zusatz im Serum oder im PBS enthalten war.

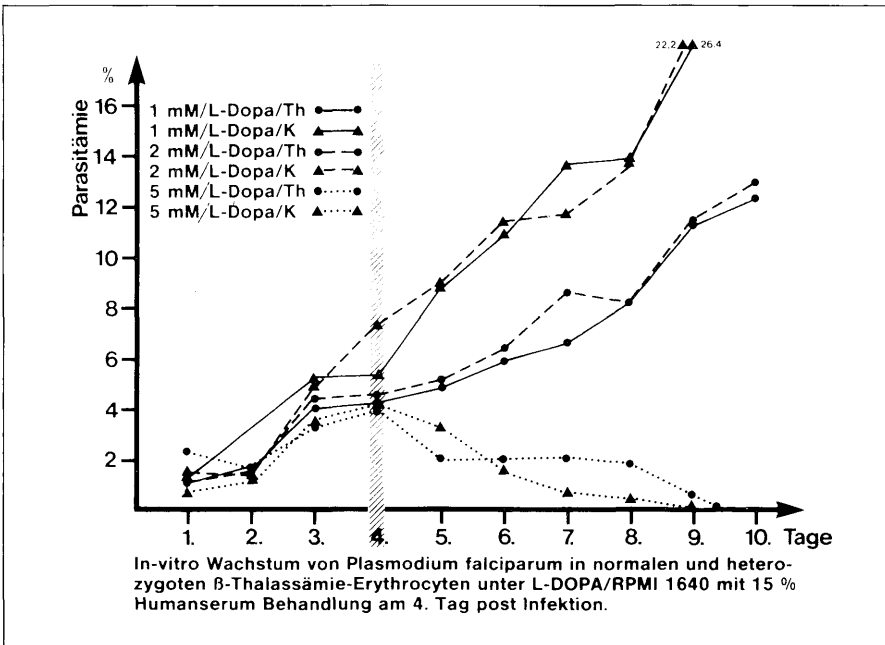


Abb. 3

Diskussion

Nach FRIEDMANN (1979) und IFEDIBA et al. (1985) sind Thalassaemie-Erythrozyten besonders anfällig gegen Oxidationsstreß, durch den die Membran-Lipid-Struktur zerstört und sekundär ein für die Plasmodien nachteiliger Kalium-Mangel eintritt. Unsere in-vitro-Versuche ergaben, daß Malariaplasmodien in frisch entnommenen Erythrozyten von heterozygoten β -Thalassaemie-Trägern über zwei bis drei Entwicklungszyklen

einen Oxidationsstreß von 30% O₂-Konzentration überstehen. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß sich diese Situation in Langzeitversuchen über 5 Tage ändern kann (BUTCHER 1981; MIYAGAMIN und WAKI 1985).

In zwei Wochen bei +4° C gelagerten Erythrozyten, in welcher Zeit nach PASVOL et al. (1982) und TRAGER (1982) charakteristische Membranveränderungen eintreten und sich der intrazelluläre Kaliumgehalt vermindert, zeigte sich selbst bei der optimalen Sauerstoffkonzentration von 17% eine deutliche Wachstumsminderung. Offensichtlich scheint vor allem das Alter der verwendeten Erythrozyten eine Rolle zu spielen. Auch der Oxidationsstreß (bei 30% O₂) wirkt sich bei den älteren Erythrozyten eher aus.

Eine 3%ige Sauerstoffkonzentration, wie sie von anderen Untersuchern in rotierenden Systemen („slow flow“ rotator) noch für ausreichend befunden wurde, erwies sich bei unseren Versuchen in einem nicht rotierenden Inkubator für die Plasmodienentwicklung als zu niedrig.

Nicht enzymatische L-DOPA oxidiert als starkes Reduktionsmittel Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfat (GSSG) unter NADP-Verbrauch. Die Erythrozyten benötigen jedoch Glutathion zur funktionellen Integrität ihrer Zellmembran und damit zur Aufrechterhaltung ihres intrazellulären Elektrolyt-Milieus. Die Plasmodien brauchen ihrerseits, wie schon erwähnt, einen hohen intrazellulären Kaliumgehalt. Dieses wird ihnen so durch den L-DOPA-Einfluß entzogen. Aus unseren Versuchsergebnissen kann gefolgert werden, daß L-DOPA welches in relativ hoher Konzentration in Favabohnen enthalten ist, speziell die späten Trophozoiten- und Schizontenstadien von Plasmodium falciparum über eine Schädigung der Erythrozyten bei einer Konzentration von 5 mmol/l in-vitro beeinflusst (KOSOWER und KOSOWER 1967; BEUTLER 1970).

GOLENSER et al. (1983) berichteten über einen ähnlich wachstumshemmenden Effekt von Isouramil, das im Fava-Bohnen-Extrakt in noch höherer Konzentration als L-DOPA enthalten ist. Auch Isouramil wirkt als Oxidationsstreß negativ auf die späten Trophozoiten und Schizonten ein. Die Ringformen blieben bei Behandlung sowohl von L-DOPA als auch mit Isouramil unbeeinflusst. Da unser Versuch nicht an Erythrozyten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel durchgeführt wurde, spielte der spezifisch hämolytische Effekt der Favabohnen keine Rolle.

Wie anfangs bereits erwähnt, kommen für einen eventuellen Schutz von Erythrozyten gegen eine Plasmodieninfektion unterschiedliche Faktoren ursächlich in Betracht. Versuche mit in-vitro-Kulturen vermögen sicherlich nur Teileffekte aufzudecken. Nach unseren Ergebnissen spielt offenbar die Alteration von Erythrozyten eine entscheidende Rolle.

Zusammenfassung

Unsere in-vitro-Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von Plasmodium falciparum bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (3–30%) ergaben, daß die Plasmodien sowohl in frisch gewonnenen β -Thalassaemie-Erythrozyten als auch in normalen Erythrozyten einen Oxidationsstreß von 30% O₂ über drei Entwicklungszyklen lang überdauern. Ein extrem niedriger O₂-Gehalt verminderte das Parasitenwachstum in normalen Erythrozyten und führte bei den β -Thalassaemie-Erythrozyten zu ihrem Absterben. Die Plasmodien wuchsen bei 17% O₂ in beiden Erythrozytenarten am besten.

Erythrozyten, die zwei Wochen bei +4° C gelagert waren, zeigten eine generell reduzierte Plasmodieninvasion. Sauerstoffkonzentrationen von 3% und 30% hatten bei ihnen eine absolut letale Wirkung. Damit konnte bewiesen werden, daß die Erythrozytenalteration unter zusätzlichem Oxidationsstreß einen entscheidenden Einfluß auf das Plasmodienwachstum hat. Das Parasitenwachstum war bei den älteren Erythrozyten bei 22% O₂ optimal.

Eine Behandlung der mit Plasmodien infizierten Erythrozyten mit L-DOPA hatte einen wachstumshemmenden Effekt nur auf die späten Trophozoiten- und Schizonten-Stadien. Bei einer 5 mmol/l Konzentration war das Wachstum der Plasmodien sowohl in normalen als auch in β -Thalassaemie-Erythrozyten vollständig gehemmt. Bei Konzentrationen von 1 und 2 mmol/l zeigte sich ein Unterschied in der Parasitenentwicklung zwischen normalen und β -Thalassaemie-Erythrozyten ab dem 5. Tag, wie er auch ohne L-DOPA-Behandlung auftritt.

Summary

In-vitro studies on the development of *Plasmodium falciparum* in normal and in β -thalassaemic erythrocytes at various oxygen concentrations and under L-DOPA influence

Our in-vitro studies on the development of *Plasmodium falciparum* at various oxygen concentrations (3%–30%) show the survival of the parasites at least for three development cycles in oxygen load of 30% O₂ in normal and in β -thalassaemic erythrocytes as well.

Very low O₂ concentrations reduced the development of the parasites in normal erythrocytes, but led to death in β -thalassaemic erythrocytes. The plasmodium grew best at 17% O₂ in both types of erythrocytes.

An over all reduced invasion of plasmodia occurred if the erythrocytes had been stored for two weeks at +4° C. O₂ concentrations of 3% and of 30% killed the parasites cultivated with both types of stored erythrocytes.

These results give evidence, that the alteration of the erythrocytes is very important for the development of the parasites. The plasmodia cultivated with stored erythrocytes grew best at 22% O₂.

Short treatment of the infected erythrocytes with L-DOPA reduced only the development of the trophozoite or schizont stage of the parasites. The growth of the plasmodia was stopped in normal and β -thalassaemic erythrocytes as well as concentrations of 5 mmol/l L-DOPA. A difference of the development in normal erythrocytes from the growth in β -thalassaemic-erythrocytes could be observed at L-DOPA concentrations of 1 or 2 mmol/l only since the 5th day, as it occurred in the controls as well.

Literatur

- ALLISON, A. C. (1961): Genetic factors of resistance to malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 91, 710–721.
- BEUTLER, E. (1970): L-DOPA and favism. *Blood* 36, 523–525.
- BUTCHER, G. A. (1981): A comparison of static thin layer and suspension cultures for the maintenance in vitro of *Plasmodium falciparum*.
- FAIRBANKS, V. F.: Thalassaemias and related disorders. In: DECKER, B. C.: *Hemoglobinopathies and thalassaemias*, Thieme Verlag, New York, 1980.

- FRIEDMANN, M. J. (1979): Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature* 280, 245–247.
- FRIEDMANN, M. J. et al. (1979): The role of hemoglobins S, C and N in the inhibition of malaria parasite development in vitro. *Trop. Med. Hyg.* 28, 777–780.
- FRIEDMANN, M. J., TRAGER, W. (1981): Malariaresistenz: Tödliche Gene als Lebensretter. *Spektrum der Wissenschaft*, 87–99.
- FRIEDMANN, M. J.: Expression of inherited resistance to malaria. In: *Ciba Foundation: Malaria and the red cell*, Pitman, London, 1983.
- GOLENSER, J. et al. (1983): Inhibition effect to a Fava bean component on the in vitro development of *Plasmodium falciparum* in normal and G-6-PD deficient erythrocytes. *Blood* 61, 507–510.
- IFEDIBA, T. et al. (1985): *Plasmodium falciparum* in vitro: Diminished growth in hemoglobin H-disease erythrocytes. *Blood* 65, 452–455.
- KAMINSKY, R. et al. (1984): Development of *Plasmodium falciparum* in normal and β -thalassaemic erythrocytes. *H.-S. Z. phys. Chem.* 365, 1009–1010.
- KOSOWER, N. S., KOSOWER, E. M. (1967): Does 3,4-Dihydroxyphenylalanine play part in favism? *Nature* 215, 285–286.
- LAMBROS, L., VANDERBERG, J. P. (1979): Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* 65, 418–420.
- LUZATTO, L. (1974): Genetic factors in malaria. *Bull. WHO* 50, 195–202.
- MIYAGAMI, T., WAKI, S. (1985): In vitro cultivation of *Plasmodium falciparum* under aerobic atmosphere in a CO-incubator. *J. Parasitol.* 71, 262–263.
- NURSE, G. T. (1979): Iron, the thalassaemia, and malaria. *Lancet* ii, 938–940.
- PASVOL, G., WILSON, R. J. M. (1982): The interaction of malaria parasites with red blood cells. *Brit. Med. Bull.* 38, 133–140.
- PASVOL, G. et al. (1982): Erythrocytes deficient in glcophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 297, 64–66.
- POLLACK, S. (1983): Malaria and iron. *Brit. J. Haematol.* 53, 181–183.
- TRAGER, W., JENSEN, J. B. (1976): Human malaria in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- TRAGER, W., JENSEN, J. B. (1978): Cultivation of malaria parasites. *Nature* 273, 621–622.
- TRAGER, W. (1982): Cultivation of malaria parasites. *Brit. Med. Bull.* 38, 129–131.
- WILLCOX, M. A. et al. (1983): *Falciparum malaria* and β -thalassaemia trait in northern Liberia. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 77, 335–347.
- WHO WORKING GROUP (1982): Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. *Bull. WHO* 60, 643–660.

ANSCHRIFT DES AUTORS

Gudrun Mansouri
Institut für Allgemeine Hygiene und Tropenhygiene
Windausweg 2
D-3400 Göttingen

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: 1986

Band/Volume: [8](#)

Autor(en)/Author(s): Mansouri Gudrun, Kaminsky Ronald, Huppach Claudia

Artikel/Article: [In-vitro-Untersuchungen über das Wachstumsverhalten von Plasmodium falciparum in normalen und in \$\beta\$ -Thalassaemie-Erythrozyten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowie unter L-DOPA-Einfluß. 291-297](#)