

**M. PNEUMONIAE'NİN İNSAN ALVEOLER MAKROFAJLARINA TUTUNMASI**

Aydın Karaarslan\* • İlkyay Boyacıoğlu\*\* • Özlem Özdemir\*\*\*

**ÖZET**

Hemadsorbsiyon pozitif (HA+) ve cam yüzeylere tutunabilen MP129 *M. pneumoniae* suşu ile bu özellikleri göstermeyen *M. pneumoniae* FH suşunun insan alveoler makrofajlarına tutunmaları ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. HA+ *M. pneumoniae* suşlarının hemadsorbsiyon negatif (HA-) olanlara göre makrofajlara daha fazla bağlandıkları ve opsonizasyonun tutunmayı olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *M. pneumoniae* infeksiyonundan korunmada alveoler makrofajların bir savunma aracı olduğu ve aderans ve fagositoz çalışmalarında ELISA'nın daha kolay ve basit bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aderans, *Mycoplasma pneumoniae*, insan alveoler makrofajları, ELISA.

**SUMMARY****Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages**

Attachment to alveolar macrophages of *M. pneumoniae* M129 strain which is HA positive and glass-adhering and *M. pneumoniae* FH strain which does not show these features was investigated by ELISA.

It was determined that the glass-adhering and HA positive *M. pneumoniae* M129 strain was attached more to human alveolar macrophages when compared with the non glass-adhering and HA negative *M. pneumoniae* FH strain and the treatment of the bacteria with normal human serum was enhanced the attachment of both strain.

In this study, it was concluded that the human alveolar macrophages may elicit a protective response against *M. pneumoniae* infection, and ELISA is easy and simple method in adherence and phagocytosis studies.

**Key words:** Adherence, *Mycoplasma pneumoniae*, human alveolar macrophages, ELISA.

*Mycoplasma pneumoniae* solunum yolu patojeni olarak özellikleri iyi belirlenmiş bir mikoplazma türüdür. Özellikle 5-20 yaşlar arasında görülen atipik pnömoninin en önemli etkenlerinden birisi olmasının yanısıra hastanede yatmakta olan, özellikle çocuk ve genç erişkin hastaların %25'inde de pnömoniye neden olmaktadır (1). *M. pneumoniae*'nin meydana getirdiği infeksiyon, kişinin yaşı ve immün sisteminin etkinliği ile ilişkilidir (2).

*M. pneumoniae*'nin neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarının patogeneğinde, bu bakterinin epitel hücrelerine tutunma özelliği en önemli rolü oynamaktadır (3,4). *M. pneumoniae* suşlarının in vitro koşullarda sıvı besiyeri içinde pasajlarının yapılmasıyla virü-

lanları kaybolur ve bu suşlar artık trakea epitel hücrelerine tutunamazlar (5).

Virülan *M. pneumoniae* suşları ayrıca eritrositlere ve mononükleer hücrelere; cam ve plastik gibi inert yüzeylere de bağlanabilmektedir (6). Eritrositlere olan tutunma hemadsorbsiyon (HA) şeklinde tespit edilmekte (7) ve bu aktivite patojenitenin ve solunum yolu epiteline tutunmanın bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (8).

Eritrositler ve solunum yolu epiteline tutunma mekanizmaları birbirine benzemektedir (8, 9, 10, 11). Oysa mononükleer hücreler üzerindeki *M. pneumoniae* bağlanma bölgelerinin solunum yolu epitel hücrelerinden farklı olduğu saptanmış ve *M. pneumoniae*

\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Öğretim Üyesi

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

\*\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cöğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ae'nin bu hücrelere tutunmasının enfeksiyona karşı koruyucu bir yanıtın ortaya çıkmasına neden olduğuna ilişkin bazı kanıtlar elde edilmiştir (4).

Makrofajlar, mikroorganizmalarla ilk önce ve en çok ilişki içinde olan fagositer hücrelerdir. Bu hücrelerin antibakteriyel etkileri önce bakteriye tutunmakla başlamakta, fagositoz ve bakterinin parçalanmasıyla devam etmektedir (12). *M. pneumoniae* için de alveoler makrofajlar ilk karşılaştıkları hücrelerdir. Bu nedenle özellikle *M. pneumoniae* olmak üzere birçok mikoplazma türünün fagositik hücrelere tutunması ile ilgili yapılmış birçok çalışma sonucunda bu olayda görev alan adezinler tespit edilmiş, olayın kinetik özellikleri gösterilmiş; tutunma üzerine opsoninlerin ve antikorların etkisi incelenmiştir (6, 13, 14, 15, 16).

Bu çalışmada, insanlarda üst ve alt solunum yollarında enfeksiyon oluşturan *M. pneumoniae*'nin insan alveoler makrofajlarına tutunmasının ELISA yöntemiyle gösterilmesi amaçlanmıştır.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, hemadsorbsiyon pozitif olan ve cam yüzeylere tutunan M129 ve bu özellikleri taşımayan *M. pneumoniae* FH suşları kullanıldı. Bakteriler, 50 ml sıvı Channok besiyeri bulunan Roux şişelerinde 37°C'de, besiyerinin rengi kırmızıdan sarıya dönünceye kadar ortalama 7 gün inkübe edilerek üretildi. Cam yüzeyine tutunmayan bakteriler direkt olarak santrifüj tüpüne alındı. Cam yüzeye tutunan bakteriler ise, steril bir hücre kazıyıcısı ile kazınarak 5ml 0.25M NaCl içine konuldu. Her iki bakteri suspansiyonu 20 dakika boyunca, 4°C'de ve 18.000 devirde santrifüj edildi. Çökeltiler üç kez 0.2 M NaCl ile yıkandılar. *M. pneumoniae* suspansiyonlarının protein içerikleri, standart olarak sığır serum albuminin kullanıldığı Bradford yöntemiyle tespit edildi (15).

İnsan alveoler makrofajları, başka herhangi bir hastalığı ve enfeksiyonu olmayan ancak öksürük ve hemoptizisi bulunan bir hastadan bronkoskopi ile alınan bronkoalveoler lavaj sıvısından elde edildi. BAL sıvısı örnekleri 4°C'de, 5 dakika süreyle 1.000 devirde santrifüj edildi. Hücreler fosfat tamponlu su (PBS; Ph: 7.2) solusyonu ile iki kez yıkandı. Thoma lamında hücre sayısı değerlendirildi.

Daha önce tanımlanan bir modifiye ELISA yöntemi kullanılarak *M. pneumoniae*'nin insan alveoler makrofajlarına tutunması gösterildi (17). Düz tabanlı, 96 kuyucuklu mikrolaplarda her kuyucuğa 2-5x10<sup>4</sup> hücre konularak 37°C'de 1 saat boyunca tutularak; makrofajların plastik yüzeyi tek tabakalı hücre topluluğu

şeklinde kaplanmaları sağlandı. Bu süre sonunda kuyucuklar iki kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklara, PBS içinde 5-80 mg arasında protein içeriği olan *M. pneumoniae* suspansiyonu ve %1 sığır serum albumin eklendi. 30 dakika ve 4°C'de inkubasyondan sonra, tek tabakalı (monolayer) kuyucuklar tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla PBS ile yıkandı. %10 at serumu içeren PBS içinde 1:100 oranında sulandırılmış anti *M. pneumoniae* antikorları her kuyucuğa eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra kuyucuklar PBS ile 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa %10 at serumu içeren PBS içinde 1:1000 oranında sulandırılmış alkalin fosfataz ile işaretli 100 ml anti tavşan immunglobulin konarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS ile 5 kez yıkama işleminden sonra 100 ml substrat (p-nitrophenyl phosphate) her kuyucuğa eklendi. Rengin ortaya çıkması için 15-30 dakika beklendikten sonra 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda plaklar okutuldu.

Bu çalışmada,

- 1- Makrofaj içeren *M. pneumoniae* proteini içermeyen ve anti-*M.pneumoniae* yerine anti-fare IgG,
- 2- Makrofaj içeren ancak anti *M. pneumoniae* yerine anti mouse IgG,
- 3- Makrofaj içeren ancak *M. pneumoniae* antijeni yerine protein olarak başka bir antijenden oluşan kontroller kullanılmıştır.

*M. pneumoniae*'nin opsonizasyonunun incelenmesi için (100µg protein/ml'in 100µl'si) PBS ile sulandırılmış olan bakteri suspansiyonu %0.01 MgCl<sub>2</sub> ve %0.01 CaCl<sub>2</sub> içeren ortama, 100 ml sulandırılmamış normal insan serumu konularak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Opsonize olan bakteriler iki kez PBS ile yıkandı. Santrifüjden sonra dipte kalan bakteri çökeltisi 200 ml PBS-MgCa ile sulandırıldı ve opsonize olan bakterilerin makrofajlara tutunma özellikleri ELISA ile araştırıldı (18).

#### BULGULAR

Bu çalışmada cam yüzeylere tutunan ve HA+ olan *M. pneumoniae* suşlarının insan alveoler makrofajlarına, cam yüzeylere tutunmayan ve HA- olan suşlardan daha fazla oranda tutundukları ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. Şekil 1'de ELISA ile elde edilen aderans özellikleri gösterilmiştir.

Şekil 1'de görüldüğü gibi HA+ ve cam yüzeylere tutunma özelliği gösteren *M. pneumoniae* suşlarının insan alveoler makrofajlarına tutunmalarının, HA- ve cam yüzeylere tutunma özelliği olmayan *M. pne-*

*umoniae* suşlarına oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Opsone edilen ve edilmeyen *M. pneumoniae* suşlarının insan alveoler makrofajlarına tutunmaları karşılaştırılmış, her iki fenotipin tutunmalarının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 2'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA

*M. pneumoniae*, büyük çocuk ve genç yetişkinlerdeki trakeobronşit ve pnömoninin en önemli nedenlerindedir. Bu bakteri, membranında bulunan protein yapısındaki birkaç adezini sayesinde hücrelere tutunabilmektedir. Bu proteinlere sahip olmayan *M. pneumoniae* suşlarının ise bu özelliğe sahip olmadıkları belirlenmiştir (6,19,20). Solunum yolu epitel hücrelerine tutunmanın infeksiyon patogenezi açısından önemi büyüktür. Epitel hücrelerinin yanısıra, *M. pneumoniae* eritrosit ve fagositer hücrelere de tutunmaktadır. Eritrositlere bağlanma HA şeklinde belirlenmektedir. HA+ ve HA- kolonilerin genetik yapıları karşılaştırıldığında, HA+ olanların epitel hücrelerine tutunmadan sorumlu birkaç proteini kodlayan gen bölgelerine sahip oldukları, HA- suşlarda ise bu bölgelerin olmadığı saptanmıştır(21, 22). Bu nedenle HA+ özellik ve cam yüzeye tutunma, *M. pneumoniae* suşunun patojenitesinin değerlendirilmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır.

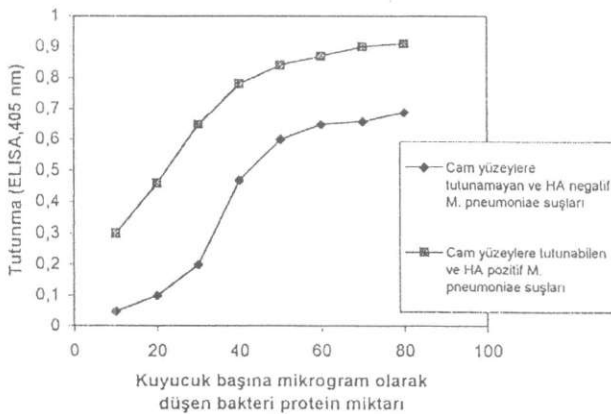
*M. pneumoniae*'nin epitel hücreleri, eritrositler, fagositer hücrelere ve bazı inert yüzeylere tutunmasını inceleyen çalışmalarda elektron mikroskopu, radyoaktif madde ile işaretleme ve sonucunda salınımın araştırılması, çeşitli boyama ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Bu sayede, tutunmadan sorumlu adezinlerin varlığı belirlenmiş, yapıları ortaya konulmuş; bu olay üzerine opsonin ve antikorların etkileri saptanmıştır(8, 18).

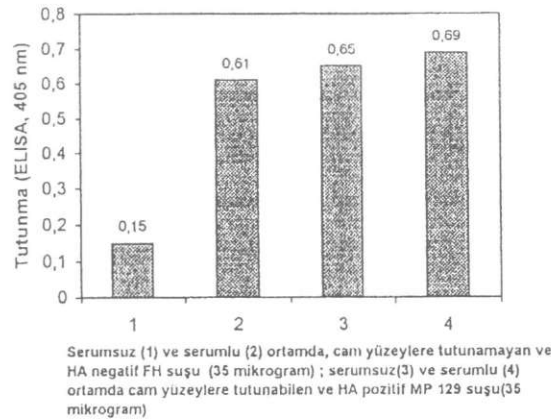
Athamna ve ark (15). *M. pneumoniae*'nin insan alveoler makrofajlarına tutunma özelliklerini ELISA ve elektron mikroskop yöntemleri kullanarak araştırmışlar, cama tutunma özelliği bulunan *M. pneumoniae* suşlarının cama tutunmayanlarınkine oranla daha fazla tutunduklarını, opsonizasyonun tutunmayı arttırdığını, dextran-sulfate gibi bazı sülfat bileşiklerinin bu tutunmayı inhibe ettiğini ve tutunmada sialik asit'in önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Krause ve Baseman (16) virülan MP 129-25C *M. pneumoniae* suşunun hamster trakea epitel hücrelerine tutunmasını araştırdıkları çalışmalarında Hoechst floresan boya, <sup>125</sup>I işaretleme, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemleri kullanarak, tutunmadan sorumlu P1, P2, P4 ve HMW 3 proteinlerini göstermişlerdir.

Çalışmamızda, HA+ ve HA- iki *M. pneumoniae* fenotipinin insan alveoler makrofajlara tutunma özellikleri ELISA ile araştırılmış ve HA+ özellik gösteren suşların makrofajlara daha fazla oranda bağlandığı tespit edilmiştir. Opsone edilen ve edilmeyen *M. pneumoniae* suşlarının insan alveoler makrofajlarına tutunmaları karşılaştırılmış, her iki fenotipin tutunmalarının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu sayede, tutunmadan sorumlu adezinlerin varlığı belirlenmiş, yapıları ortaya konulmuş; bu olay üzerine opsonin ve antikorların etkileri saptanmıştır(8, 18).



Şekil 1. *M. pneumoniae* suşlarının alveoler makrofajlara tutunmasının ELISA ile gösterilmesi



Şekil 2. İnsan serumu ile opsonizasyonun *M. pneumoniae*'nin makrofajlara tutunması üzerine olan etkisi

## KAYNAKLAR

1. Foy H, Kenny GE, Coony MK, Allan ID: Long-term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*. J Infect Dis 1979; 139: 248-254.
2. Taylor-Robinson D and Braudbury J: Mycoplasma Diseases. In: Collier L, Balows A, Susuma Max, eds. Topley and Wilson Microbiology and Microbial Infections. 9<sup>th</sup> ed. London, Hodder Head line Group. 1998; 1014-1037.
3. Collier AM and Baseman JB: Organ culture techniques with mycoplasmas. Ann N Y Acad Sci 1973; 225: 277-289.
4. Cole BC: Mycoplasma interactions with the immun system: Implications for disease pathology. ASM News 1996; 62: 471-475.
5. Powell DA, Hu PC, Wilson M, Collier AM, Baseman JB: Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to respiratory epithelium. Infect Immun 1976; 13: 959-966.
6. Razin S: Mycoplasma adherence. In: The Mycoplasmas-Mycoplasma Pathogenicity. Razin S, Barile MF, eds. Vol IV. USA. Academic Press-Inc, 1985: 161-202.
7. Soheslavsky O, Prescott B, Chanock RM: Adsorbtion of *Mycoplasma pneumoniae* to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulance. J Bacteriol 1968; 96: 695-705.
8. Krause DC, Leith DK, Wilson RM, Baseman JB: Identificati-on of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorbson and virulance. Infect Immun 1982; 35: 809-817.
9. Kahane I: In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasmas. Isr J Med Sci 1977; 20: 874-877.
10. Kahane I, Tucker S, Leith DK, Morrison-Plummer J, Baseman JB: Detection of major adhesin (P1) in triton shells of virulent *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 1985; 50: 944-946.
11. Roberts DD, Olson LD, Barile MF, Ginsburg V, Krivan HC: Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. J Biol Chem 1989; 264: 9289-9293.
12. Howard CJ, Taylor G: Humoral and cell-mediated immunity. In: The mycoplasmas. Razin S and Barile MF, eds. Vol IV. London. Academic Press, 1986; 259-292.
13. Gallily R, Avion A, Jahns-Streubel G, Mühlradt DF: Activation of macrophages and monocytes by Mycoplasmas in: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplas-mology. Razin S and Tully JG, eds. Vol I. London. Aca-demic Press, , 1995; 471-438.
14. Bredt W: Phagocytosis by macrophages of *Mycoplasma pneumoniae* after opsonization by complement. Infect Immun1975; 12: 694-695.
15. Athamna A, Kramer MR, Kahane I: Adherence of Mycoplas-ma to human alveoler macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 15: 135-141.
16. Krause DC and Baseman JB: *Mycoplasma pneumoniae* pro-teins that selectively bind to host cells. Infect Im-mun1982; 37: 382-386.
17. Athamna A and Ofek I: Enzyme-Linked Immunosorbent As-say for quantitation of attachment and ingestion stages of bacterial phagocytosis. J Clin Microbiol 1988; 26: 62-66.
18. Blumenstock E and Jann K: Natural resistance of mice to Salmonella typhimurium: Bactericidal activity and chemiluminescence responce of murine peritoneal macrophages. J Gen Microbiol 1981; 125: 173-183.
19. Dirksen LB, Krebs KA, Krause DC: Phosphorylation of cytdherence-accessory proteins in *Mycoplasma pne-umoniae*. J Bacteriol 1994; 176: 7499-7505.
20. Dallo SF, Lazzell AL, Chavaya A, Reddy SP, Baseman JB: Bi-ofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. Infect Immun1996; 64: 2595-2601.
21. Hedreyda CT, Krause DC: Identification of a possible cytdherence regulatory locus in *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 1995; 69: 3479-3483.
22. Hahn TW, Krebs KA, Krause DC: Expression in *Mycoplas-ma pneumoniae* of the recombinant gene encoding the cytdherence-associated protein HMW1 and identifi-cation of HMW4 as a product. Mol Microbiol 1996; 19: 1085-1099.