

Kalsifikasyondan sorumlu nanopartiküller (nanobakteriler)

Nanoparticles (nanobacteria) responsible from calcification

Tuba Dal¹, Mehmet Sinan Dal²

¹Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

ÖZET

Kalsifikasyondan sorumlu nanopartiküller (KNP) bilinen bakterilerden daha küçük (80-500 nm), bakterilere benzer özellikler (membran yapıları, ikiye bölünme, koloni oluşumu) gösteren partiküllerdir. KNP'ler insan ve hayvan serumlarında, insanlarda görülen patolojik kalsifikasyonlarda (böbrek taşları, dental pulpa taşları, kalp kapağı kalsifikasyonları, arter kalsifikasyonları, over kanserinde görülen psammoma cisimcikleri vs.), doğadaki kalsifikasyonlarda (travertenler vs.), Mars meteorlarında gösterilmişlerdir. KNP'ler Dulbecco' nun modifiye eagle besiyeri (DMEM) ile yapılan hücre kültürlerinde üreme özelliği göstermekte transmisyon ve scanning elektron mikroskoplar (TEM, SEM) ile incelenebilmektedir. Önceleri KNP'ler kalsiyum fostat kristallerini kapsüllerine çökelterek kalsifikasyonlara neden olan küçük bakteriler (nanobakteriler) olarak biliniyordu. Son yıllarda KNP'lerin mineral ve proteinden oluşan kompleks yapılar oldukları görüşü önem kazanmıştır. Bu görüşe göre fizyolojik koşullarda kalsifikasyon inhibitörü olarak bilinen albumin, fetuin gibi proteinler; ortamda aşırı derecede kalsiyum, fosfor varlığında KNP'lerin kalsifikasyon nidusu olarak işlev görmesine ve hidroksi apatit kristallerinin oluşmasına neden olmaktadır.

KNP'lerle ilgili bilinenlere rağmen bilinmeyenler halen çoğunluktadır. Biz de bu makalemiz ile patolojik kalsifikasyonlarda rolleri olduğu düşünülen KNP'lerle ilgili yeni çalışmaların gerekliliğini vurgulamayı amaçladık.

Anahtar kelimeler: Nanopartikül, patolojik kalsifikasyon, nanobakteriler

GİRİŞ

Kalsifikasyondan sorumlu nanopartiküller (KNP) bilinen bakterilerden daha küçük boyutta (80-500nm) ilk kez ticari hücre kültür serumlarında keşfedilen, bakteri olup olmadıkları uzun yıllar tartışma konusu olan partiküllerdir. Yapılarında hidroksi apatit kristalleri bulunduran bu partiküllerin, insan vücudunda oluşan iskelet dışı patolojik kalsifikasyonlardan

ABSTRACT

Calcifying nanoparticles (CNPs) are particles smaller (80-500nm) than known bacteria and have bacteria-like features (membrane structures, in two division, colony formation). CNPs have shown in human and animal sera, human's pathological calcifications (kidney stones, dental pulp stones, heart valve calcifications, arterial calcifications, psammoma bodies in ovarian cancer, etc.), the nature's calcifications (travertines, etc.) and Mars meteors. CNPs are able to grow in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), can be examined by transmission and scanning electron microscopes (TEM, SEM).

Previously CNPs were known as small bacteria (nanobacteria) that cause calcifications by precipitating calcium and phosphate crystals into the capsules. In recent years, the opinion that CNPs are complex structures consisting of protein and minerals has become more important. According to this opinion some proteins (such as albumin, fetuin) known as the physiological inhibitor of calcification cause to work CNPs as a nidus for calcification and the formation of hydroxy apatite crystals. Despite the known, unknowns are still the majority about CNPs. We also aimed to emphasize with this article, the need for new studies about CNPs that are thought to have the roles in pathological calcifications. *J Clin Exp Invest 2011; 2 (4): 463-467*

Key words: Nanoparticle, pathological calcification, nanobacteria

(böbrek taşları, dental pulpa taşları, kalp kapağı kalsifikasyonları, arter kalsifikasyonları, over kanserinde görülen psammoma cisimcikleri vs.) ve doğadaki kalsifikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir.¹

Kalsifikasyondan sorumlu nanopartiküllerin keşfinde Finlandiya'da bulunan Kuopio Üniversitesi'nden Kajander ve Çiftçioğlu önemli rol oynadı. Bu araştırmacılar memeli hücre kültürüyle yaptıkları bir çalışma

Yazışma Adresi /Correspondence: Dr. Tuba Dal

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye Email: tuba_dal@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 15.03.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 04.04.2011

Copyright © Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

sırasında kültürdeki hücrelerin bir türlü üremediğini veya üreme olan kültürlerde ise hücrelerin sitoplazmalarında anormal vakuoller bulunduğunu gözlemlediler. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile yaptıkları incelemeleri sonucunda kültür hücrelerinin içlerinde kok şeklindeki bakterilere benzeyen, ikiye bölünme özelliği gösteren küçük partiküller olduğunu fark ettiler. Kajander ve ekibi bu partikülleri; "kendini kopyalayıp, filtrelerden geçebilen biyolojik parçacık" olarak tanımladılar ve bu partiküllere nanobakteri ismini verdiler.^{1,2,3} Bu araştırmacılar 0,2-0,5 µm çapındaki, kalın hidroksi apatit kapsülü olan nanobakterileri, fetal sığır serumu (gama ışınına maruz kalmamış) kullanılan DMEM hücre kültürlerinde üretmeyi başardılar. Öte yandan bu partiküllere fetal sığır serumu dışında, atların ve insanların kan ürünlerinde de rastladılar. Nanobakterilerin kristalizasyon merkezi olarak işlev gördüğünü, kalsiyum ve diğer mineralleri çevrelerinde sentezledikleri kapsüle çökelterek, hücre içi ve dışı kalsifikasyonla taş oluşumuna neden olduklarını açıkladılar. Hidroksi apatitten oluşan bu kapsülün nanobakterinin incelenmek üzere sabitlenmesini, boyanmasını ve kırılmasını zorlaştırdığını, hücre kültüründe kullanılan antibiyotiklere direnç kazanmasını sağladığını ileri sürdüler. Bu çalışmaların diğer bir sonucu ise ikiye bölünme süreleri (doubling time) normal hücre kültürü koşullarında 1-5 gün olan, ısıya dayanıklı, spesifik bir immün yanıt oluşturan, özgül antikorlarla boyanabilen bu partiküllerin üremelerinin yüksek doz aminoglikozit grubu antibiyotikler, EDTA, sitozin-arabinozot ve gama-radyasyon ile önlenemediği idi.^{1,2,3} Kajander ve ekibi DNA izolasyonunu ve 16S rDNA analizi ile bu partiküllerin Bartonella, Brucella'nın da içinde bulunduğu Proteobakterlerin alt grubuna ait bir bakteri olduğunu ilan ettiler. Nanobakterilerin prototipini Nanobacterium sanguineum olarak adlandırdılar. Kajander ve ekibi Nanobac adında bir şirket kurarak nanobakterilere ait ürünleri (elde ettikleri standart suş, antikorlar) resmileştirdiler. Sonraki yıllarda birçok araştırmacı çalışmalarında kontrol gruplarında bu ürünleri kullandı.¹⁻³

Dr. Kajander ve ekibinin nanobakterilerin varlığını ilan ettiği yıllarda başka bir araştırmacı Texas Üniversitesi'nden Robert L. Folk İtalya'da bulunan Viterbo travertenlerinde boyutları 10-200 nm arasında değişen mikroorganizmaların varlığını ileri sürerek bunları "nannobakteriler" olarak isimlendirdi.⁴ Sonraki yıllarda NASA'dan Romanek adlı araştırmacı, McKay ve arkadaşları Marstan gelen ALH84001 meteorunda 20 ile 200 nm boyutlarında nanobakteri benzeri yapılar bulunduğunu bildirdiler.^{5,6}

Nanobakterilerin (KNP) kalsifikasyon ile ilişkilerinin gösterilmesinin ardından Kajander ve ekibi,

böbreklerine nanobakteri enjeksiyonu yapılan ratlarda böbrek taşı oluştuğunu ve idrarda nanobakterilerin izole edildiğini gösterdiler. Aynı çalışmada nanobakterilerin invitro olarak fibroblastlara sitotoksik olduklarını ve kollektör tübülleri hasara uğrattıklarını bildirdiler.⁷

Takip eden yıllarda Sedivy ve arkadaşları overin papiller karsinomunda görülen psammoma cisimciklerinde, Wen Y ve arkadaşları safra kesesi taşlarında, Michel Drancourt ve arkadaşları da üst üriner sistem taşlarında, KNP varlığını gösterdiler.⁸⁻¹⁰

Kalsifikasyondan sorumlu nanopartiküllerin kardiyak ve vasküler kalsifikasyonların etyopatogenezinde de önemli bir etken olduğu bilim çevreleri tarafından merak konusuydu. Birçok araştırmacı kalsifiye kalp kapaklarında ve arterlerde KNP'leri izole etmeyi başardılar.¹¹⁻¹⁶ Bu konuyla ilgili çalışmalardan birinde Hu Y ve arkadaşları, kalsifiye kapak örneklerinin ve Se90 pozitif kontrol suşunun nanobakteriyel antikorla (Nanobac Oy, Kuipo, Finland) boyandığını ancak normal kapakların ve γ ışınına maruz bırakılmış serum örneğinin (negatif kontrol) antikorla boyanmadığını gözlemlediler. Antikorla boyanan örneklerin hücre kültürlerinde de nanobakterileri izole ettiler.¹⁵ Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise Candemir ve arkadaşları mitral anüler kalsifikasyonu (MAC) olan hastalarda anti CNP antikor (The Nano-Sero IgG kit, Nanobac Oy, Kuipo, Finland) titrelerinin ilişkisini araştırdılar. Çalışmaya ekokardi-yografide mitral anüler kalsifikasyon (MAC) saptanan 93 hastayı ve MAC saptanmayan altta yatan bir risk faktörü olmayan (hipertansiyon (HT), diyabetes mellitus (DM), dislipidemi) 94 hastayı dahil ettiler. Sistemik HT, DM, dislipidemi prevalansının yüksek görüldüğü MAC'lı hastalarda Anti CNP titrelerinin yüksek olduğunu diğer grupta ise düşük olduğunu bildirdiler.¹⁶

Bununla birlikte Tsurumoto ve arkadaşları artiri olan hastaların sinovyal sıvılarında, Altundağ ve arkadaşları akciğer kanserindeki kalsifikasyonlarda, Agabagov ve arkadaşları plesentada görülen ve embriyo için zararlı etkileri olan patolojik plasental kalsifikasyonlarda KNP'leri izole ettiler.¹⁷⁻¹⁹

Zhang ve arkadaşları KNP'leri testiküler mikrolitiyazis (TM) adı verilen infertiliteye neden olan bir hastalık grubuyla ilişkilendirdi. Zhang ve ekibi TM'si olan 17 hasta grubundan ve TM'si olmayan 17 kontrol grubundan örnekler alarak nanobakteri kültürü yaptılar. Ardından 3-7 hafta sonunda kültür flasklarının dibindeki üremeyi gözlemlediler. TM'si olan hastaların semen örneklerinin 10'unda, idrar örneklerinin 2'sinde ve TM'si olmayan kontrol grubu örneklerinin 1'inde üreme saptadılar.²⁰

Bazı çalışmalarla KNP'lerin dental pulpa taşlarının, gingivit ve kronik periodontitin etyopatogenezinde rolü olduğu ileri sürüldü.²¹⁻²²

Son yıllarda, KNP'lerin sorumlu olduğu düşünülen hastalıkların tedavisi de merak konusu oldu. Antibiyoterapinin bu hastalıkların tedavisinde etkili olduğuna dair bir dizi çalışma yayımlandı. Bununla ilgili olarak Zhou ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışma ile kronik pelvik ağrı sendromu olan ve geleneksel tedavilere rağmen iyileşemeyen Tip III prostatit tanılı hastalarda tetrasiklin tedavisinin etkinliğini araştırdı. Hastaları rastgele olarak iki gruba ayırarak; ilk gruba antibiyotik tedavisi verirken ikinci gruba plasebo verdiler. Tedavi öncesinde ve sonrasında prostatik sekresyonlarda ve idrar örneklerinde KNP varlığını araştırdılar. Tedaviden sonra KNP izolasyon oranının prostatik sekresyonlarda %62'den %16'ya, idrarda %12,5'dan %0'a düştüğünü gözlemlədiler.²³ Zhang ve arkadaşları da bir çalışmada intertisiyel böbrek kisteri ve ağrılı mesane sendromu (IC/PBS) olan, biyopsi ve idrar örneklerinde KNP üretilen hastalara tetrasiklin tedavisi uyguladılar. Tedavinin ardından hastalarda semptomlarının gerilediğini, örneklerde nanobakteri düzeylerinin düştüğünü gözlemlədiler.²⁴

KNP'ler ile ilgili çalışmalar günümüzde de büyük bir hızla devam etmektedir. Biz de makalemiz ile bilinmeyen yönleriyle bilim çevrelerinin halen ilgisini çeken KNP'lerin önemini vurgulamayı ve yeni çalışmalara ışık tutmayı amaçladık.

TARTIŞMA

Kajender ve ekibi tarafından kalsifikasyondan sorumlu partiküller bilim çevrelerine bir bakteri türü olarak tanıtıldı. Ancak Kajender'in bu hipotezine karşıt olan en çarpıcı araştırma John O. Cisar tarafından yapıldı. Cisar inek serumu, insan salyası ve diş plağı gibi çeşitli örneklerden elde ettiği nanobakteri benzeri partiküllerden DNA izolasyonları yaptı. Elde ettiği 16S rDNA dizilerinin PCR yönteminde sıklıkla bulaşmaya neden olan *Phyllobacterium mysinacearum* ile neredeyse aynı olduğunu ileri sürdü. Cisar bu çalışması ile nanobakterilerin gerçek bir bakteri olmadığını, cansız makromoleküller olduğunu ve mikrokristal apatitlerinin kendiliğinden yayılarak subkültürlerde kalsifikasyonlar oluşturduğunu bildirdi.²⁵ Cisar'ın bu çalışmasına rağmen sonraki yıllarda mikrobiyologlar daha çok bu partiküllerin hastalıklarla olan ilişkisini araştıran çalışmalar yaptı. Bu partiküllerle ilgili birçok soru ise yakın bir zamana kadar cevaplanamadı.

Raoult ve arkadaşlarına ait 2008 yılında yapılan bir çalışmada nanobakterilerin cansız makromo-

leküller olduğu fikrinin öne sürülmesi bu konudaki çalışmalara ayrı bir boyut kazandırdı. Raoult ve arkadaşları KNP'lerin (nanoplar olarak adlandırdılar) DNA'se ve RNA'se'dan etkilenmediklerini ancak gama radyasyon, uv, EDTA, Tripsin, tetrasiklin grubu antibiyotiklerle inhibe olduklarını ve immunolojik yanıt oluşturduklarını gösterdiler. Elde ettikleri 16S rRNA dizilerinin ise PCR'da kontaminasyona neden olan diğer bakterilere ait olduğunu ortaya koydular. SDS-PAGE analizleri sonucunda KNP'lerin apatit ve fetuinden oluşan kompleksler olduğunu ve bu mineralofetuin komplekslerin belirli koşullarda yayılarak kalsifikasyonlara neden olduklarını bildirdiler. Patolojik kalsifikasyonlar için bir inhibitör olarak bilinen fetuinin nasıl olup da kalsifikasyonlara neden olabileceği sorusuna yanıt olarak yeni bir hipotez öne sürdüler. Bu hipoteze göre fetuinde meydana gelen yapısal değişiklikler sonucunda yeni bir fetuin izoformu oluşmakta bu da kalsifikasyonlara neden olmaktadır.²⁶

Aynı yıl Martel ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada invitro olarak hazırladıkları CaCO₃ presipitatlarını, insan serumundan elde ettikleri KNP'ler ile belirli özellikler açısından kıyasladılar. Oluşturdukları CaCO₃ presipitatlarının membran şekilleri, bölünme benzeri formasyonları, koloniler halinde birikmeleri gibi özellikleri açısından KNP'lere şaşırtıcı derecede benzediğini gösterdiler. Elde ettikleri CaCO₃ presipitatlarında ve KNP'lerde bakteri DNA'sına rastlamadılar. KNP'lerin çevresinde yer alan hidroksi apatit kristalleri birikiminin ortamdaki CO₂ ve NaHCO₃ miktarları ve CaCO₃ birikimini etkileyen diğer faktörlerden etkilendiklerini ortaya koydular. Bu çalışmada Martel ve ekibinin elde ettiği başka bir veri ise pıhtılaşmış kandan izole ettikleri KNP'lerin çevresinde hidroksi apatit kristallerine rastlanmamasıydı. Bu veriye dayanarak kanda bulunan proteinlerin KNP'lere bağlandığını ve oluşan bu kompleksin hidroksi apatit birikimini inhibe ettiğini düşündüler. Western Blot incelemeleri sonucunda daha önce belirlenen ve nanobakteriler için spesifik olan monoklonal antikorların (8D10) serum albuminle reaksiyona girdiğini tespit ettiler.²⁷

2009 yılında Young ve arkadaşları KNP'lerin protein ve minerallerden oluşan bileşikler olduğunu bir kez daha kanıtlayarak bu konudaki pek çok tartışmaya son noktayı koydular. Bu araştırmacılar serum içeren kültür sıvısına presipite olan iyonlar (kalsiyum, karbonat, fosfor) ekleyerek KNP'lere benzer özellikler gösteren yapılar elde ettiler. Bu yapıların fetuin A, apolipoprotein A1, albumin içerdiğini, pasajlar sonrasında proteinlerin miktarlarının değiştiğini ve bu proteinlerin nanobakterilere spesifik antikorlarla reaksiyona girdiğini gösterdiler. Fetuin ve albuminin

nanopartikül formasyonunu inhibe ettiklerini ama aşırı kalsiyum veya kalsiyum fosfat varlığında bu inhibisyonun üstesinden gelemeyerek kalsifikasyon nidusu işlevi gördüklerini ortaya koydular.²⁸

Son yıllarda yapılan bu çalışmaların sonucunda önceleri nanobakteriler olarak bilinen KNP'lerin mineraller ve proteinlerlerden oluşan cansız kompleks yapılar oldukları düşüncesi bilim çevreleri tarafından kabul gördü.

KNP'ler ile ilgili ortaya konulan bu gelişmeler KNP'lerin kalsiyum homeostasisinden sorumlu fizyolojik mekanizmaların bir ürünü olduğu düşüncesi ni akla getirmektedir.

Yakın gelecekte KNP'lere ait sırların çözülmesinin patolojik kalsifikasyonlarla seyreden ve insan hayatını tehdit eden hastalıklar ile ilgili olumlu gelişmelere yol açacağı kanısındayız. Hatta bazı araştırmacılar KNP'lerin biyomineralizasyon özelliklerinden yararlanılarak kırık dişlerin ve kemiklerin tedavisinin mümkün olabileceğini savunmaktadır.^{29,30}

Biz de bu makalemizle KNP'lerin kalsifikasyonla seyreden hastalıkların etyopatogenezindeki önemini ortaya koymak, bu konudaki bilinmeyenlerin halen çoğunlukta olduğunu ve yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu vurgulamak istedik.

KAYNAKLAR

- Kajander EO, Kuronen I, Akerman K, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1997;3111(3):420-8.
- Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kajander EO. Stone formation and calcification by nanobacteria in human body. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 1998;3441(1):105-11.
- Ciftcioglu N, Bjorklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K, Kajander EO. Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* 1999;56(5):1893-8.
- Folk, Robert L. Nanobacteria: surely not figments, but what under heaven are they? *Natural Science* 1997;1(3):1-4.
- Romanek CS, Thomas KL, Gibson EK Jr, McKay DS, Socki RA. Petrogenesis of carbon-and sulfur-bearing minerals in the martian meteorite ALH 84001. *Lunar Planet Sci*; XXVI 1995; 26(12):1183-4.
- McKay DS, Gibson EK, Thomas-Keprta KL, Vali H, Romanek CS. No 'nanofossils in martian meteorite: reply. *Nature* 2007; 390(2):455-6.
- Kajander EO, Ciftcioglu N, Miller-Hjelle MA, Hjelle JT. Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Cur Opin Nephrol Hypertension* 2001;10 (3):445-52.
- Sedivy R, Battistutti WB. Nanobacteria promote crystallization of psammoma bodies in ovarian cancer. *APMIS* 2003;111(8):951-4.
- Wen Y, Li YG, Yang ZL et al. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J* 2005;118(5):421-4.
- Drancourt M, Jacomo V, Lépidi H et al. Attempted isolation of nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):368-72.
- Puskas LG, Tiszlavicz L, Razga Z, Torday LL, Krenacs T, Papp JG. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques. *Acta Biol Hung* 2005;56 (3-4):233-45.
- Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005;111(24):3316-26.
- Piper C, Dreier J, Kleesiek K, Körfer R, Horstkotte D. Nanobacteria to promote degenerative aortic valve stenosis? *J Heart Valve Dis* 2006;15(4):499-501.
- Bratos-Pérez MA, Sánchez PL, García de Cruz S et al. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification. *Eur Heart J* 2008;29(3):371-6.
- Hu YR, Zhao Y, Sun YW, et al. Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol* 2009;19(5):286-92.
- Candemir B, Ertas FS, Cansin Tulunay Kaya, Ozdol C, Hasan T, Akan OA, Sahin M, Erol C. Association between antibodies against calcifying nanoparticles and mitral annular calcification. *J Heart Valve* 2010;19(6):745-52.
- Tsurumoto T, Matsumoto T, Yonekura A, Shindo H. Nanobacteria-like particles in human arthritic synovial fluids. *J Proteome Res* 2006;5(5):1276-8.
- Altundag K, Altundag O, Akyurek S, et al. Possible association between nanobacteria and malignant microcalcifications in breast cancer. *Breast J* 2006;12(3):287-9.
- Agababov RM, Abashina TN, Suzina NE et al. Link between the early calcium deposition in placenta and nanobacterial-like infection. *J Biosci* 2007;32 (6):1163-8.
- Zhang Q-H, Lu G-S, Shen X-C, Zhou Z-S, Fang Q, Zhang X, Li L-K, Jin X-Y, Song B. Nanobacteria May Be Linked to Testicular Microlithiasis in Infertility. *J Androl* 2010;31(2): 121-5.
- Zeng JF, Zhang W, Jiang HW, Ling JQ. Isolation, cultivation and initial identification of Nanobacteria from dental pulp stone. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006;41(8):498-501.
- Zhang SM, Tian F, Jiang XQ et al. Evidence for calcifying nanoparticles in gingival crevicular fluid and dental calculus in periodontitis. *J Periodontol* 2009;80(9):1462-70.
- Zhou Z, Hong L, Shen X et al. Detection of nanobacteria infection in type III prostatitis. *Urology* 2008;71(6):1091-5.
- Zhang QH, Shen XC, Zhou ZS, et al: Decreased nanobacteria levels and symptoms of nanobacteria-associ-

- ated interstitial cystitis/painful bladder syndrome after tetracycline treatment. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2010;21(1):103-9.
25. Cisar JO, XU DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L, and Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(21):1511-5.
 26. Raoult D, Drancourt M, Azza S et al. Nanobacteria are mineralo fetuin complexes. *PLoS Pathog* 2008;4(2):41-5.
 27. Martel J, Young J D-E. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *PNAS* 2008;105(14): 5549-54.
 28. Young DJ, Martel J, Young L, Wu C-Y, Young A, Young D. Putative nanobacteria Represent physiological remnants and culture by-products of normal calcim homeostasis. *Plos One* 2009;4(2):4417-20.
 29. Yang F, Zeng J, Zhang W, Sun X, Ling J. Evaluation of the interaction between calcifying nanoparticles and human dental pulp cells: a preliminary investigation. *Int J Nanomedicine* 2011;15(6):13-8.
 30. Lin Y, Zheng R, He H, Du H. Application of biomimetic mineralization: a prophylactic therapy for cracked teeth? *Med Hypotheses* 2009;73(4):493-4.