

И. П. Кайдашев

Высшее государственное учебное заведение Украины “Украинская медицинская стоматологическая академия МЗ Украины”, 36024 Полтава

КАЛЬЦИФИЦИРУЮЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ (обзор литературы)

(Представлено чл.-кор. НАН и НАМН Украины И. С. Чекманом)

Проанализированы современные данные о природе, строении и этиопатогенетическом значении кальцифицирующих наночастиц (КНЧ). Дана критическая оценка результатов исследований КНЧ как нанобактерий, сделан вывод о преждевременности использования этого термина. Подчеркнута обоснованность концепции о природе КНЧ как физико-химического феномена. Рассмотрено присутствие КНЧ в тканях и органах при заболеваниях, связанных с патологической кальцификацией (нефролитиаз, поликистоз почек, атеросклероз, кальцификация клапанов сердца, плаценты, заболевания периодонта и пульпы зуба). Сделан прогноз дальнейших исследований КНЧ, среди главных — выделение и секвенирование возможной ДНК/РНК из КНЧ, разработка точных методов идентификации КНЧ, разработка экспериментальных моделей изучения этиопатогенетических свойств КНЧ, изучение возможного иммунного ответа на КНЧ, эпидемиологические и гигиенические исследования КНЧ.

Ключевые слова: кальцифицирующие наночастицы, нанобактерия, патологическая кальцификация, ДНК, РНК, прогноз исследований.

Современная медицинская наука значительное внимание уделяет междисциплинарному подходу, активно используя научные результаты, полученные в различных областях фундаментальной и прикладной науки. Примером такого плодотворного подхода может служить разностороннее исследование наномира, начиная от создания наночастиц, изучения свойств уже существующих, и до использования нанороботов, наномоторов и т. д. [2]. Лидером по числу разработок, находящихся в стадии клинических исследований, и по уровню внедрения в клиническую медицину является нанофармакология. При этом открываются совершенно уникальные свойства различных часто хорошо известных соединений в наносостоянии, разрабатываются системы доставки таких соединений, что существенно воздействует на развитие медицины [4]. Сама природа выступила искусным изобретателем, применив целую систему нанотехнологических устройств, характеризующихся высочайшим коэффициентом по-

лезного действия, исключительной универсальностью и надежностью [5].

В современном аналитическом обзоре ведущих украинских ученых были выделены основные перспективные направления исследований в области изучения наноструктур, среди которых — установление всех аспектов взаимодействия наноструктур с организмом человека и внешней средой [3]. Логическим продолжением этой концепции может явиться исследование роли эндогенных наноструктур и наномеханизмов в развитии патологических процессов в организме человека — “нанопатология”. Одним из таких процессов является кальцификация, наблюдающаяся при самых различных заболеваниях, и для которой сегодня уже получены доказательства участия наноструктур.

Кальцифицирующие наночастицы (КНЧ) (нанобактерии, частицы, подобные нанобактериям, нанобы) были открыты как контаминаты клеточных культур более 25 лет назад [18]. Термин “нано-

И. П. Кайдашев — проректор по научной работе, зав. кафедрой внутренних болезней с уходом за больными, д.м.н., профессор (kaidashev@yandex.ru)

бактерии” был впервые предложен Ричардом Морита, дальнейшее развитие этого направления связано с Р. Фолком [12]. Внедрение представления о нанобактериях как об отдельном микроорганизме *Nanobacterium sanguineum* связано с именами ученых Олави Каяндера и Нева Чифтиоглу [17]. В настоящее время общепринятым является взгляд на КНЧ как минерало-белковые комплексы [30].

Тем не менее, вопрос о природе этих частиц по сей день активно обсуждается, так как не существует еще совершенного исследования, которое бы окончательно определило, что КНЧ являются наименьшей самореплицирующейся формой жизни на планете или что КНЧ представляют собой минерало-белковые комплексы, не имеющие никакого отношения к бактериям [21].

Согласно современным представлениям, КНЧ представляют собой частицы 80-500 нм в диаметре (могут проходить через 100 нм фильтры). Обычно имеют кокковую, коккобациллярную или бациллярную форму, встречаются минерализованные “игло-подобные” структуры. Эти частицы имеют гидроксипатитную оболочку, клеточно-мембранозную структуру и центральную полость. Показано, что КНЧ могут образовывать микроскопические колонии (>1 мм диаметром) при низкой концентрации питательных веществ во внешней среде. Делятся расщеплением пополам, фрагментацией и почкованием [2, 17].

КНЧ окрашиваются по Граму отрицательно, окрашиваются ДНК-специфическими красителями (*Hoechst 332858* в концентрации 5 мкг/мл 50 мин, пропидиум йодид, *PicoGreen* — окраска специфична после фильтрации через фильтры с размером пор 0,10-0,22 мкм, оптимальной является окраска после деминерализации); применяется окраска по *von Kossa*; окраска 2 % уранил ацетатом (возможно с цитратом свинца) может обнаруживать специфическую слизь на гидроксипатитной оболочке; в минерализованном состоянии могут окрашиваться ализариновым красным S; окрашиваются фосфорновольфрамовой кислотой [19, 20, 26].

КНЧ устойчивы к нагреванию при 90 °С в течение 1 часа, к облучению в дозе до 30 кГрей, к 5 % раствору NaCl. В минерализованном состоянии устойчивы к действию ряда ферментов — лизоцима, протеиназы К, липаз, амилаз, щелочей, ультразвуку, R α -излучению, детергентам и растворителям. Температура ниже 37 °С угнетает репликацию и предотвращает образование биопленки.

Получены данные, что КНЧ проявляют резистентность к широкому спектру антибиотиков: аминогликозидам в фармакологических концентрациях, хлорамфениколу, линкозамидам, цефалоспорином, макролидам, фторхинолонам, глико-

пептидам в фармакологических концентрациях, полимиксинам, противотуберкулезным препаратам, аминоциклитолу, спектиномицину.

Чувствительны к тетрациклинам, ампициллину, триметропиму, триметропим-сульфаметоксазолу, нитрофурантоину, 5-фторурацилу, цитозин арабинозиду, антимицину А, азиду натрия, цианистому калию, бифосанатам, 6-аминокапроевой кислоте [10]. Рост *in vitro* угнетается EDTA, EGTA и цитратом [21].

КНЧ демонстрируют характерные культуральные свойства: время удвоения составляет 72 часа, в бессывороточной среде — 6 суток. Пассаж может производиться в средах DMEM или RPMI-1640 независимо от присутствия сыворотки. Оптимально содержание 5 % CO $_2$ в атмосфере. Чувствительны к 2-меркаптоэтанолу, который стимулирует рост анаэробов, но не могут культивироваться в строгих анаэробных условиях. Кальцифицируются, если концентрация сыворотки в культуральной среде менее 5 %. Цитотоксичны для фибробластов и лимфоцитов [21].

Характерной особенностью КНЧ является низкая скорость обмена веществ в 1000 раз ниже, чем у *E.coli*. Включают уридин (в предполагаемую нуклеиновую кислоту), метионин и аспарагиновую кислоту (в предполагаемую систему биосинтеза белка) [29]. Кальцифицируются при физиологических значениях pH (7,4) Уреаза-отрицательны.

В современной литературе описаны многие методы обнаружения КНЧ. Среди них исторически важное место занимает бактериоскопия (окраска *Hoechst 33258*, пропидиум йодидом, *Pico Green* после деминерализации) с использованием сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, окраска по *von Kossa*, которая специфична к кальциевым компонентам, окрашивание 2 % уранил ацетатом (с цитратом свинца) для выявления специфической слизи на гидроксипатитной оболочке, окраска ализариновым красным S в минерализованном состоянии, окраска фосфорновольфрамовой кислотой, после длительного культивирования может использоваться окраска по *von Kossa* в сочетании со световой микроскопией.

Определенное значение имеет бактериологический метод (культивация в DMEM или RPMI-1640 без сыворотки при 37 °С 4-6 недель после фильтрации через фильтры с порами 0,10-0,22 мкм), репликация может оцениваться спектрофотометрически при 650 нм.

Серологический метод (антигены КНЧ и анти-КНЧ моноклональные антитела 8/0 к порину, 5/2 к пептидогликану и 8DIO к порину, *NanoBiotech Pharma*, Финляндия) — ИФА, иммуногистохимия, иммунофлюоресценция по Оухтерлони [8].

Одним из лидирующих методов обнаружения и идентификации микроорганизмов в современной науке является геномный метод (ПЦР), но существуют сомнения, что существующие праймеры обнаруживают нуклеиновую кислоту КНЧ, а не нуклеиновую кислоту контаминирующих бактерий [11]. Протеомный метод (электрофорез в ПААГ после денатурации додецилсульфатом натрия с последующей идентификацией белков масс-спектрометрией).

Получены первые результаты эффективности терапевтических мероприятий, направленных на лечение заболеваний, предположительно связанных с КНЧ — применение тетрациклина, EDTA и лечебное питание [23, 34]. Однако, данных многоцентровых клинических исследований и полноценной доказательной базы в литературе не обнаружено.

Кальцифицирующие наночастицы — нанобактерии или физико-химическое явление?

На сегодняшний день существование КНЧ является доказанным фактом, не ясной окончательно представляется природа этих частиц. Существует две точки зрения на КНЧ — нанобактерии или минерало-белковые комплексы. Гипотеза о КНЧ как живых организмах (нанобактерии) базируется на морфологическом сходстве с бактериями, способности культивирования на различных средах и возможности деления [17]. КНЧ могут окрашиваться ДНК-специфическими красителями, ДНК и РНК присутствуют в соотношении, характерном для *E. coli* [20]. Также ДНК и РНК идентифицированы с помощью электронно-микроскопии [6]. КНЧ могут включать ³⁵S-метионин, ³H-L-аспарагиновую кислоту и 5-³H-уридин при культивировании [17, 29]. Показано присутствие в частицах эндотоксина и перекрестная реактивность липополисахаридов *Chlamydia spp* и антигенов *Bartonella spp* [15].

Живую природу КНЧ усматривают в чувствительности ко многим антимикробным препаратам, обладающим антиметаболической активностью, и не имеющим хелатирующих свойств [10]. Усиление репликации и снижение образования биопленок после фотобиостимуляции [37].

После деминерализации КНЧ обнаруживается присутствие бактериальных белков (*EF-Tu*, *EF-G*, *GroEL*, дигидролипоамид ацетилтрансфераза пируватдегидрогеназы, полирибонуклеотиднуклеотидилтрансфераза, фруктозо-связывающая альдолаза, шаперон *ClpB*) [20, 33].

Отсутствие репликации в строго анаэробных условиях и стимуляция репликации β-меркапто-

этанолом рассматривается некоторыми исследователями как доказательство нанобактериальной природы КНЧ. Патогенная активность деминерализованных КНЧ [31] и отличающаяся патогенность КНЧ и кристаллов гидроксиапатита [42].

КНЧ имеют экстремально малый размер (часто менее 140 нм — минимальный размер живых форм), их геном еще не расшифрован. Крайне низкий уровень обмена веществ (в 1000 раз медленнее, чем *E. coli*) может скорее представляться артефактом.

Обнаружена ассоциация гидроксиапатита КНЧ с альбумином, фетуином А, аполипопротеинами, белками системы свертывания крови и фибринолиза, иммуноглобулинами, макроглобулинами, белками комплемента, предшественниками интерлейкинов, кининогеном, фибронектином, витронектином, белком связующим витамин D, предшественником антитрипсина, серотрансферинном, синтрофином, гликопротеином Тамма — Хорсфалла, гликогенином, сывороточным компонентом амилоида, амилазой слюны, белками цитоскелета, аденозилгомоцистеиназой, субъединицами гемоглобина [45, 46]. Эти факты свидетельствуют об участии широко распространенных сывороточных белков в образовании КНЧ.

Морфологическое подобие различным минеральным и минерально-белковым комплексам, содержащим неорганический кальций, фосфор и апатит, а также белки и фосфолипиды [11, 46].

Устойчивость КНЧ к действию ДНКаз и РНКаз [30], также поддерживает физико-химическую природу феномена. Критическое влияние концентрации инертных газов, CO₂ и NaHCO₃ на репликацию КНЧ [24] показывает зависимость КНЧ от физико-химического состава среды.

Образование КНЧ в физиологических сывороточных условиях после нарушений гомеостаза, которые не характерны для живущих организмов [24, 30, 46]. Приведенные данные о физико-химической природе феномена не умаляют его значения для биологии и медицины, и тем более не отвергают необходимости его дальнейшего изучения.

Гипотеза о КНЧ как физико-химическом феномене (минерально-белковые комплексы) представляется более вероятной и доказывается многими факторами. Ниже будут проанализированы современные данные возможной роли КНЧ в этиологии и патогенезе различных заболеваний, и, соответственно, о методах терапии, основанных на новых знаниях о свойствах КНЧ.

Один из актуальных вопросов современной наномедицины, требующий принципиального ответа, — являются ли КНЧ бактерией или физико-химическим явлением. От решения этого вопроса

зависит дальнейший прогресс в понимании этиологии, патогенеза многих широко распространенных заболеваний, а также в разработке современных терапевтических технологий.

Рассмотрим основные данные, влияющие на наше понимание природы КНЧ.

Одним из ключевых пунктов является минимально возможный размер живых организмов. В исследовании *J. Maniloff* [22] был обоснован минимально возможный размер для самореплицирующихся форм жизни около 140 нм. Однако, спустя десятилетия были получены результаты, что *Mycoplasma laboratorium* может иметь меньшие размеры, имея только 387 генов, кодирующих белки, и 43 гена, кодирующих РНК, что является достаточным для независимого существования [13]. Более того, если уменьшить содержание воды в бактерии с 70 % до 20 %, ее размер может достигнуть 75 нм при сохранении жизнеспособности [39]. Исходя из этого, экстремально малый размер КНЧ сам по себе не может исключать то, что КНЧ может быть особой формой жизни. Соответственно, метаболические системы КНЧ могут быть намного более компактными по сравнению с другими организмами.

Классическое понимание размерности наночастиц предусматривает их размер во всех трех измерениях в пределах до 100 нм, частицы более 100 нм называют субмикронными, поэтому нами усматривается некоторое терминологическое несоответствие.

Следующим важным фактом является расшифровка возможного генома КНЧ. Существует результат нескольких попыток секвенирования нуклеиновых кислот, входящих в КНЧ, предполагается возможная контаминация образцов другими бактериями, такими, как *Phyllobacterium myrsinacearum* [20]. Тем не менее, многие исследования показали ДНК-специфическое окрашивание КНЧ. Также известны удачные попытки выделения РНК и ДНК из КНЧ [6, 20]. При этом нельзя исключить присутствие нуклеопротеидов либо как матрицы для образования КНЧ, либо их сорбцию на сложной поверхности.

Предположение, что нуклеиновые кислоты просто связываются с поверхностными высокозаряженными молекулами минерально-белковых комплексов, а не синтезируются внутри КНЧ, были частично опровергнуты результатами [19, 20, 26], описывающими ДНК-специфическое окрашивание деминерализованных КНЧ. Кроме того, было показано включение $5\text{-}^3\text{H}$ -уридина в КНЧ во время культивирования, что предположило наличие обмена веществ в КНЧ и продукцию собственных нуклеиновых кислот. Включение меченных метионина и аспарагиновой кислоты предполагает наличие собственной системы биосинтеза белка,

невозможной без нуклеиновых кислот. Эти предположения подтверждаются обнаружением среди белков, входящих в КНЧ, трансляционных факторов элонгации, полирибонуклеотиднуклеотидилтрансферазы, шаперонов *GroEL* и *ClpB*, которые подобны их прокариотическим аналогам. Однако, уровень включения меченных аминокислот и нуклеотидов очень близок к контрольным значениям и, по-видимому, не может служить достаточным доказательством живой природы КНЧ.

Проведенный протеомный анализ обнаружил множество сывороточных белков в составе КНЧ и не обнаружил специфических бактериальных белков, что позволило отдельным исследователям рассматривать КНЧ только как минерально-белковый комплекс. Однако другим группам исследователей удалось обнаружить бактериальные белки которые, по их мнению, не случайно связаны с минерально-белковой оболочкой КНЧ [19, 20, 26, 33]. Следует отметить, что все обнаруженные белки являются бактериальными, относятся только к системам репликации, биосинтеза белка и метаболизма, что поддерживает гипотезу о том, что КНЧ имеют лишь ограниченное число собственных белков, обеспечивающих функционирование витально важных систем.

Перекрестная реактивность моноклональных антител (МКАТ) к возможным специфическим белкам КНЧ (порин и пептидогликан) с сывороточными белками (альбумин и фетуин А) может показывать ненадежность данных о специфичности порина и фетуина А для КНЧ. Возможно, получение более специфичных антител к другим эпитопам приведет к развитию более точной детекции и вызовет прогресс в этой области. Тем не менее, данные о росте концентраций анти-КНЧ антител (собственно, к порину и фетуину А) при ряде заболеваний, на чем остановимся ниже, косвенно подтверждает роль порина и пептидогликана КНЧ в формировании их патогенного потенциала.

Критическим фактором является описанная устойчивость КНЧ к действию РНКаз и ДНКаз, так как КНЧ продолжали свою репликацию независимо от присутствия этих ферментов [30]. Это может отражать отсутствие РНК и ДНК, участвующих в образовании КНЧ. Однако, это может показывать и мощное защитное действие минерально-белковой оболочки КНЧ по отношению к нуклеиновым кислотам, находящимся внутри, что подтверждается резким снижением репликации КНЧ после деминерализации. Таким образом, факт такой устойчивости к действию ДНКаз и РНКаз не решает основного вопроса о природе КНЧ. Тем не менее, снижение репликации после деминерализации подчеркивает важность именно минерального компонента, а не нуклеиновых кислот. В этой связи возможен и иной взгляд на тормозящее

действие тетрациклина на увеличение числа КНЧ вследствие его способности связывать ионы кальция.

Зависимость репликации КНЧ от факторов среды (концентрация CO_2 , инертных газов, NaHCO_3) предполагает химическую модель образования КНЧ, так как увеличение концентрации усиливает репликацию и наоборот. Тем не менее, такая модель может объяснять образование минеральной оболочки КНЧ и не касается присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот. По сути, эти данные показывают важность наличия условий для образования минеральной оболочки в репликации КНЧ.

В ряде исследований было показано, что КНЧ могут образовываться в сыворотке, даже подвергшейся γ -облучению, как минерально-белковые комплексы при определенных изменениях гомеостаза и, таким образом, не могут рассматриваться как живые объекты. Однако *G. Mathew* и соавт. [25] показали, что КНЧ могут реплицироваться даже в отсутствие сыворотки, что показало независимость их образования от сывороточных белков.

Подытоживая все за и против гипотезы о КНЧ как нанобактериях, следует отметить, что сегодня нельзя однозначно ответить на вопрос о природе КНЧ, хотя наиболее обоснована концепция минерально-белковых комплексов, которую, на наш взгляд, следует расширить до “минерально-белково-нуклеино-липидных” комплексов.

В то же время, необходимо принимать во внимание наличие весьма критических публикаций, касающихся методологии исследований природы КНЧ как нанобактерий, то есть способных выступать в качестве новой формы жизни. В этой связи весьма поучительна работа *P. Urbano* и *F. Urbano* [38], в которой поэтапно анализируется массив данных о нанобактериях — от возникновения термина, до коммерциализация результатов исследований. Трудно не согласиться с мнением авторов о недостаточной обоснованности взгляда на КНЧ как о новой форме жизни, и необходимости дальнейших исследований в недостаточно изученной области патологических кальцификаций.

Замечательные в историческом плане комментарии к проблеме нанобактерий дает *M. Wainwright* [41], из чего следует, что принимая во внимание исторический аспект, необходимо вернуться к изучению фильтрующихся форм известных микроорганизмов на современном методическом уровне.

Одним из фундаментальных вопросов в понимании природы нанобактерий является доказательство наличия в них ДНК. Одной из последних работ [14] была выполнена очередная попытка определить в КНЧ присутствие 16Sr ДНК. В данном исследовании из кальцифицированной плаценты были выделены КНЧ, покрытые электроноплот-

ной оболочкой с диаметром от 50 до 500 нм, содержащие “нуклеиноподобный материал”. После выделения и 4-недельной культивации из КНЧ была выделена 16Sr ДНК. Результаты секвенирования показали, что КНЧ могут представлять собой новые нанобактерии (*Gen Bank JF823648*).

Вслед за публикацией этих данных появились комментарии о противоречивости полученных данных и возможности иных интерпретаций. При этом обсуждается не сам факт наличия КНЧ, а их принадлежность к нанобактериям и их природа [32].

Группой американских ученых была показана возможность образования КНЧ в растворах гемоглобина в присутствии солей NaCl , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и наночастиц оксида железа [7].

Роль КНЧ в этиологии и патогенезе некоторых заболеваний

Дискуссия о природе КНЧ не оказывает влияния на изучение присутствия КНЧ в организме человека. Множество данных о присутствии КНЧ в различных тканях и при различных заболеваниях делает весьма привлекательным предположить этиопатогенетическую роль КНЧ при заболеваниях, связанных с патологической кальцификацией (таблица).

Обнаружение КНЧ при некоторых заболеваниях

Заболевание, патологическое состояние	Методы выявления
Нефролитиаз	Серологический, бактериологический, бактериоскопический
Поликистоз почек	Серологический, бактериоскопический, бактериологический
Образование плазмозных телец в злокачественных опухолях яичников	Серологический
Кальцификация коронарных артерий и сердечных клапанов	Серологический [23, 26]
ВИЧ-инфекция	Серологический [28]
Атеросклеротические бляшки	Серологический, бактериоскопический, бактериологический [29]
Хронический простатит, синдром хронической тазовой боли	Серологический [34]
Холециститиаз	Серологический, бактериоскопический, бактериологический [43]
Патологическая кальцификация плаценты	Бактериоскопический [6]
Заболевания периодонта и пульпы зубов	Серологический, бактериоскопический, бактериологический [9, 44]

Одним из самых изученных заболеваний с точки зрения участия КНЧ является нефролитиаз: КНЧ были впервые выделены и культивированы из различных почечных камней; практически все почечные камни содержат апатит, который является компонентом минеральной оболочки КНЧ; КНЧ на сегодня является единственным агентом, продуцирующим апатит в почках; КНЧ, выделенные из почечных камней, при культивировании образуют себе подобные; меченные радиоактивным технецием КНЧ при введении кролям обнаруживались в тканях почек и в моче [19].

Достаточно большое число исследований было проведено для определения роли КНЧ в этиологии и патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *V. S. Maniscalco* и *K. A. Taylor* [23] показали, что терапия *EDTA* 1500 мг в ректальных свечах и тетрациклином 500 мг перорально совместно с набором нутрицевтиков, в течение 4 мес проявляла эффективность при заболевании коронарных артерий. Было обнаружено присутствие КНЧ в кальцинированных тканях аневризм, сердечных клапанов и бляшках сонных и бедренных артерий, в то время как в некальцинированных тканях эти частицы отсутствовали [26]. В экспериментальных исследованиях была показана цитотоксичность КНЧ в отношении артерий [3]. Ответ на введение минерализованных КНЧ окклюзиями артерий, иногда с канализацией. Деминерализованные КНЧ проявляли менее выраженное патогенное действие. В этом исследовании также было показано, что артерии со здоровым эндотелием были резистентны к действию КНЧ.

Была установлена определенная связь между уровнями анти-КНЧ антител и риском кальцификации митрального клапана: контаминация митрального клапана КНЧ индуцирует иммунный ответ, развивается воспаление и дальнейшая кальцификация; КНЧ могут нарушать состав и количество микрофлоры и приводить к инфицированию и образованию биопленки [8].

Получены результаты, что КНЧ могут фагоцитироваться макрофагами независимо от размера частиц, но только КНЧ большого размера или их агрегаты (около 1 мкм) индуцирует клеточный ответ и продукцию митохондриальных активных форм кислорода, секрецию интерлейкина-1 β , активацию каспазы 1 [27].

В то же время, получены современные данные о присутствии генома патогенных микроорганизмов различных групп в тканях атеросклеротических бляшек артерий людей, умерших от ишемической болезни сердца [35, 36].

Присутствие кальцифицирующих микровезикул и макрофагов в атеросклеротических бляшках уже сегодня может быть использовано для изуче-

ния атеросклеротических поражений и установления риска дестабилизации бляшки [40].

Важным фактом является участие КНЧ в развитии заболеваний полости рта. Было показано, что КНЧ при воздействии на клетки десневого эпителия вызывает вакуолизацию и кальцификацию [48]. Цитопатическое действие КНЧ проявляют и на клетки пульпы зуба человека, вызывая появление камней в пульпе [47].

Основные данные современного состояния вопроса о роли КНЧ в современной медицине формализованы на схеме.



Мало изученным направлением является исследование влияния размера КНЧ на их биологически активные и цитопатогенные свойства. Таким образом, КНЧ обнаруживаются при многих заболеваниях, протекающих с явлениями избыточной кальцификации, проявляют цитопатическое действие, предположительно могут вызывать иммунное воспаление. КНЧ могут принимать участие в образовании биопленок.

Заключение

В настоящее время основной задачей, стоящей перед исследователями, является выделение возможного генома из КНЧ и точное его секвенирование. До получения этих точных знаний невозможно ответить на вопрос, являются ли КНЧ новой формой жизни и употребление термина “нанобактерия” является преждевременным.

Тем не менее, независимо от научных знаний о природе КНЧ, явно прослеживается важное значение этих образований в этиологии и патогенезе многих заболеваний. Это, в свою очередь, определяет важность разработки методов лечения забо-

леваний с учетом роли КНЧ и, соответственно, методов диагностики и контроля за лечением.

Существующие методы идентификации КНЧ еще далеки от идеальных: анти-КНЧ антитела выявляют многие белки биологических жидкостей; бактериоскопический метод очень сложен, дорог и трудоемок; бактериологический — очень долгод и несовершенен.

Широко применяемый метод ПЦР ограничен в данном случае отсутствием данных о предполагаемом геноме. Необходимо унифицировать терминологию, описывающую КНЧ, с учетом размеров (1-100 нм — наночастицы; >100 нм, но менее 500 нм — субмикронные частицы), так как размер частиц может влиять на их этиопатогенетические свойства.

Основываясь на перечисленных этапах изучения КНЧ и их свойств можно прогнозировать несколько направлений дальнейших исследований КНЧ:

- 1) основным направлением фундаментальных исследований КНЧ должно стать выделение и секвенирование возможной ДНК и доказательство возможности ее репликации;
- 2) разработка новых валидных методов идентификации КНЧ и диагностики КНЧ-опосредованных/зависимых заболеваний;
- 3) разработка экспериментальных моделей для доказательства этиопатогенетических свойств

КНЧ и терапевтической эффективности возможных лекарственных средств; изучение цитопатогенных свойств КНЧ, зависимости свойств КНЧ от их размеров;

- 4) изучение возможного иммунного ответа на КНЧ независимо от их природы, выделение антигенов из КНЧ (экзогенного и эндогенного происхождения), синтез моноклональных антител, определение звеньев иммунного ответа преимущественно осуществляющих реакции на КНЧ (субпопуляции лимфоцитов, антитела, цитокины и т.д.);
- 5) проведение эпидемиологических и гигиенических исследований, направленных на изучение распространенности КНЧ и мер профилактики ассоциированных с ними заболеваний.

В заключение хотелось бы привести высказывание Клода Бернара (1858): "... самое лучшее, что мы можем сделать для содействия прогрессу научной медицины, это совершенствовать наши экспериментальные методы исследования, применяемые в физиологии и патологии. Если принципы экспериментального метода тождественны, как мы сказали, в науках о жизни и в науках о мертвых телах, то приемы исследования необходимо будут различны в силу особой природы явлений жизни, которые очень тонки и крайне изменчивы" [1].

Список использованной литературы

1. Бернар К. Лекции по экспериментальной патологии. — Москва-Ленинград: Изд-во биол. и мед. лит-ры, 1937. — 400 с.
2. Волков С. В., Ковальчук С. П., Генко В. М., Решетняк О. В. Нанохімія. Наносистеми. Наноматеріали. — К.: Наук. думка, 2008. — 422 с.
3. Патон Б., Москаленко В., Чекман І., Мовчан Б. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти // Вісн. НАН України. — 2009. — № 6. — С. 18-26.
4. Чекман І. С. Нанофармакологія. — К.: Задруга, 2011. — 424 с.
5. Чекман І. С., Сімонов П. В. Природні наноструктури та наномеханізми. — К.: Задруга, 2012. — 104 с.
6. Agababov R. M., Abashina T. N., Suzina N. E. et al. Link between the early calcium deposition in placenta and nanobacterial-like infection // J. Biosci. — 2007. — 32, № 6. — P. 1163-1168.
7. Baum J. L., Jones R. L., Manning T. J. et al. Hemoglobin aggregates studied under static and dynamic conditions involving the formation of nanobacteria-like structures // Acta Pharm. — 2012. — 62, № 2. — P. 201-209.
8. Candemir B., Ertas F. S., Kaya C. T. et al. Association between antibodies against calcifying nanoparticles and mitral annular calcification // J. Heart Valve Dis. — 2010. — 19, № 6. — P. 745-752.
9. Ciftcioglu N., McKay D. S., Kajander E. O. Association between nanobacteria and periodontal disease // Circulation. — 2003. — 108, № 8. — P. e58-59.
10. Ciftcioglu N., Miller-Hjelle M. A., Hjelle J. T., Kajander E. O. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measured by a modified microdilution method // Antimicrob. Agents Chemother. — 2002. — 46, № 7. — P. 2077-2086.
11. Cisar J. O., Xu D. Q., Thompson J. et al. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization // Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. — 2000. — 97, № 21. — P. 11511-11515.
12. Folk R. L. SEM imaging of bacteria and nanobacteria in carbonate sediments and rocks // J. Sediment. Petrol. — 1993. — 63. — P. 990-999.
13. Glass J. I., Assad-Garcia N., Alperovich N. et al. Essential genes of a minimal bacterium // Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. — 2006. — 103, № 2. — P. 425-430.
14. Guo Y., Zhang D., Lu H. et al. Association between calcifying nanoparticles and placental calcification // Int. J. Nanomed. — 2012. — 7. — P. 1679-1686.
15. Hjelle J. T., Miller-Hjelle M. A., Poxton I. R. et al. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease // Kidney Int. — 2000. — 57, № 6. — P. 2360-2374.
16. Hudelist G., Singer C. F., Kubista E. et al. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization // Histopathol. — 2004. — 45, № 6. — P. 633-637.
17. Kajander E. O., Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation // Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. — 1998. — 95, № 14. — P. 8274-8279.

18. *Kajander E. O., Kuronen I., Akerman K. et al.* Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on earth. — *Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology* / Ed. R. B. Hoover. — Proc SPIE, 1997. — P. 420-428.
19. *Khullar M., Sharma S. K., Singh S. K. et al.* Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population // *Urol. Res.* — 2004. — **32**, № 3. — P. 190-195.
20. *Kumar V., Farrell G., Yu S. et al.* Cell biology of pathologic renal calcification: contribution of crystal transcytosis, cell-mediated calcification, and nanoparticles // *J. Investig. Med.* — 2006. — **54**, № 7. — P. 412-424.
21. *Kutikhin A. G., Brusina E. B., Yuzhalin A. E.* The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine // *Int. J. Nanomed.* — 2012. — **7**. — P. 339-350.
22. *Maniloff J.* Nannobacteria: size limits and evidence // *Science.* — 1997. — **276**, № 5320. — P. 1773-1776.
23. *Maniscalco B. S., Taylor K. A.* Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy // *Pathophysiol.* — 2004. — **11**, № 2. — P. 95-101.
24. *Martel J., Young J. D.* Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles // *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* — 2008. — **105**, № 14. — P. 5549-5554.
25. *Mathew G., McKay D. S., Ciftcioglu N.* Do blood-borne calcifying nanoparticles self-propagate? // *Int. J. Nanomed.* — 2008. — **3**, № 2. — P. 265-275.
26. *Miller V. M., Rodgers G., Charlesworth J. A. et al.* Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2004. — **287**, № 3. — P. 1115-1124.
27. *Peng H. H., Wu C. Y., Young D. et al.* Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids // *Small.* — 2013. — **9**, № 13. — P. 2297-2307
28. *Pretorius A. M., Sommer A. P., Aho K. M., Kajander E. O.* HIV and nanobacteria // *HIV Med.* — 2004. — **5**, № 6. — P. 391-393.
29. *Puskás L. G., Tiszlavicz L., Rázga Z. et al.* Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques // *Acta Biol. Hung.* — 2005. — **56**, № 3-4. — P. 233-245.
30. *Raoult D., Drancourt M., Azza S. et al.* Nanobacteria are mineralo fetuin complexes // *PLoS Pathog.* — 2008. — **4**, № 2. — P. e41. — doi: 10.1371/journal.ppat.0040041. [8]
31. *Schwartz M. A., Lieske J. C., Kumar V. et al.* Human-derived nanoparticles and vascular response to injury in rabbit carotid arteries: proof of principle // *Int. J. Nanomed.* — 2008. — **3**, № 2. — P. 243-248. [23]
32. *Shiekh F. A.* Do calcifying nanoparticles really contain 16S rDNA? // *Int. J. Nanomed.* — 2012. — **7**. — P. 5051-5052. — doi: 10.2147/IJN.S35987.
33. *Shiekh F. A., Charlesworth J. E., Kim S. H. et al.* Proteomic evaluation of biological nanoparticles isolated from human kidney stones and calcified arteries // *Acta Biomater.* — 2010. — **6**, № 10. — P. 4065-4072.
34. *Shoskes D. A., Thomas K. D., Gomez E.* Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience // *J. Urol.* — 2005. — **173**, № 2. — P. 474-477.
35. *Skochko O. V., Bobrova N. A., Izmaylova O. V., Kaidashev I. P.* Role of several periodontopathogenic microorganisms and tlr4 gene Asp299Gly polymorphism in atherosclerosis pathogenesis // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* — 2011. — № 5. — P. 83-86.
36. *Skochko O. V., Vesnina L. E., Boborova N. A. et al.* Quantitative analysis of individual groups of microorganisms, extracted from atherosclerotic lesions in the coronary arteries in patients depending on ASP299GLY polymorphism of TLR4 gene // *Lik Sprava.* — 2012. — № 3/4. — P. 82-86.
37. *Sommer A. P., Hassinen H. I., Kajander E. O.* Light-induced replication of nanobacteria: a preliminary report // *J. Clin. Laser Med. Surg.* — 2002. — **20**, № 5. — P. 241-244.
38. *Urbano P., Urbano F.* Nanobacteria: facts or fancies? // *PLoS Pathog.* — 2007. — **3**, № 5. — P. e55.
39. *Volke F.* Nannobacteria: size limits and evidence. 1997. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://naturalscience.com/ns/letters/ns_let02.html.
40. *Wagner S., Schnorr J., Ludwig A. et al.* Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization // *Int. J. Nanomed.* — 2013. — **8**. — P. 767-779.
41. *Wainwright M.* Nanobacteria and associated 'elementary bodies' in human disease and cancer // *Microbiology.* — 1999. — **145**, № 10. — P. 2623-2624.
42. *Wang L., Shen W., Wen J. et al.* An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria // *Dig. Dis. Sci.* — 2006. — **51**, № 6. — P. 1126-1132.
43. *Wen Y., Li Y. G., Yang Z. L. et al.* Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis // *Chin. Med. J. (Engl.).* — 2005. — **118**, № 5. — P. 421-424.
44. *Yang F., Zeng J., Zhang W. et al.* Evaluation of the interaction between calcifying nanoparticles and human dental pulp cells: a preliminary investigation // *Int. J. Nanomed.* — 2010. — **15**, № 6. — P. 13-18.
45. *Young J. D., Martel J., Young D. et al.* Characterization of granulations of calcium and apatite in serum as pleomorphic mineralo-protein complexes and as precursors of putative nanobacteria // *PLoS One.* — 2009. — **4**, № 5. — P. e5421.
46. *Young J. D., Martel J., Young L. et al.* Putative nanobacteria represent physiological remnants and culture by-products of normal calcium homeostasis // *PLoS One.* — 2009. — **4**, № 2. — P. e4417.
47. *Zeng J., Yang F., Zhang W. et al.* Association between dental pulp stones and calcifying nanoparticles // *Int. J. Nanomed.* — 2011. — **6**. — P. 109-118.
48. *Zhang S. M., Tian F., Jiang X. Q. et al.* Evidence for calcifying nanoparticles in gingival crevicular fluid and dental calculus in periodontitis // *J. Periodontol.* — 2009. — **80**, № 9. — P. 1462-1470.

Получено 3.06.2013

**КАЛЬЦИФИКУЮЧИ НАНОЧАСТИНКИ:
СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ
(огляд літератури)**

І. П. Кайдашев

Вищий державний навчальний заклад України “Українська медична стоматологічна академія
МОЗ України”, 36024 Полтава

Проаналізовані сучасні дані про природу, будову і етіопатогенетичне значення кальцифікуючих наночастинок (КНЧ). Надано критичну оцінку результатів досліджень КНЧ як нанобактерій, зроблено висновок про передчасність використання цього терміна. Підкреслена обґрунтованість концепції про природу КНЧ як фізико-хімічного феномена. Розглянуто присутність КНЧ в тканинах і органах при захворюваннях, пов'язаних з патологічною кальцифікацією (нефролітіаз, полікістоз нирок, атеросклероз, кальцифікація клапанів серця, плаценти, захворювання періодонта і пульпи зуба). Зроблено прогноз подальших досліджень КНЧ, серед головних — виділення і секвенування можливої ДНК/РНК з КНЧ, розробка точних методів ідентифікації КНЧ, розробка експериментальних моделей вивчення етіопатогенетичних властивостей КНЧ, вивчення можливої імунної відповіді на КНЧ, епідеміологічні та гігієнічні дослідження КНЧ.

**CALCIFYING NANOPARTICLES:
CURRENT STATE OF THE PROBLEM
(review of literature)**

I. P. Kaidashev

State Institution of Higher Education of Ukraine “Ukrainian Medical Stomatological Academy
Ministry of Health Ukraine”, 36024 Poltava

Analyzed were current data on the nature, structure, and etiopathogenetic significance of calcifying nanoparticles (CNP). Critical evaluation of research results of CNP as nanobacteria has been performed, and conclusion about prematurity of using this term was made. The relevance of the concept of CNP as a physical and chemical phenomenon has been emphasized. Considered was CNP presence in tissues and organs in diseases associated with pathological calcification (nephrolithiasis, multicystic kidney disease, atherosclerosis, calcification of heart valves, placenta, disorders of periodontium and dental pulp). The prognosis for further CNP research has been made, including extraction and sequencing of possible DNA/RNA from CNP, development of accurate methods for CNP identification and of experimental models for studying etiopathogenetic properties of CNP, study of possible immune response to CNP, epidemiological and hygienic studies of CNP.