

بررسی وجود نانوذرات کلسیفیه در سنگ کلیه، سنگ صفرا و پلاک آترواسکلروزیس

امیر ایزدی^{۱*}، الهام مسلمی^۲

خلاصه

مقدمه: نانوذرات کلسیفیه به شکل‌های مختلفی در رسوبات کلسیم و فسفات وجود دارند. شواهد اخیر حاکی از آن است که شاید نانوذرات کلسیفیه (Calcifying nanoparticles یا CNPs) همانندساز هستند. بیماری‌های مختلفی را به نانوباکترها (Nanobacteria یا NB) ارتباط داده‌اند که از آن جمله می‌توان به سنگ‌های کلیه، سنگ کیسه صفرا، پلاک‌های قلبی-عروقی، پلاک‌های دهانی-دندانی و بسیاری از سرطان‌ها و بیماری‌های خودایمنی اشاره نمود. هدف از این مطالعه، بررسی وجود نانوباکترها در سنگ کلیه، سنگ کیسه صفرا و پلاک‌های آترواسکلروزیس و همچنین مقایسه آن‌ها با یکدیگر از نظر شکل ساختاری بود.

روش: در مطالعه حاضر ۱۸ نمونه سنگ کلیه، ۱۵ نمونه سنگ کیسه صفرا و ۱۱ نمونه پلاک آترواسکلروزیس طی عمل جراحی تهیه و جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی NB از نمونه‌ها و تأیید آن‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی (Scanning electron microscope یا SEM)، مقداری از نمونه‌ها در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد و گلوتامات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد هوا به مدت ۸ هفته کشت داده شد. پروتکل استخراج DNA (Deoxyribonucleic acid) بر روی نمونه‌ها انجام شد، سپس به وسیله تکنیک PCR (Polymerase chain reaction) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۱۸ نمونه سنگ کلیه در ۱۷ نمونه کشت مثبت دیده شد. از ۱۵ نمونه سنگ کیسه صفرا ۱۴ نمونه کشت مثبت و در نهایت هر ۱۱ پلاک آترواسکلروزیس دارای کشت مثبت بودند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی رشد و وجود CNP در تمام نمونه‌ها تأیید گردید. برای تمام نمونه‌ها تست PCR انجام شد، ولی هیچ DNA از نمونه‌ها با پرایمرهای استفاده شده شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که وجود نانوذرات کلسیفیه به وسیله روش کشت و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت، ولی از آنجایی که در مطالعه حاضر وجود اسید نوکلئیک تأیید نشد، باید برای اثبات وجود آن‌ها توسط PCR تحقیقات بیشتری صورت گیرد. با توجه به رشد نانوذرات در محیط‌های کشت مختلف و مشاهدات میکروسکوپی، می‌توان یکی از عوامل مهم در ایجاد سنگ کلیه، سنگ کیسه صفرا و پلاک‌های آترواسکلروزیس را وجود این میکروارگانیسم‌ها قلمداد کرد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات کلسیفیه، کشت، PCR

۱- کارشناس گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق و باشگاه پژوهشگران و نخبگان، تهران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: amir_izad@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۸/۲۹

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۷/۱۲

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۲/۲۷

مقدمه

نانوذرات کلسیفیه کننده (Calcifying nanoparticles) یا CNPs) که به عنوان نانوباکتر (Nanobacteria یا NB) شناخته می‌شوند، به شکل‌های مختلفی در رسوبات کلسیم، کریستال‌های آپاتیت، کلسیم، فسفات فیزیولوژیک و فسفات وجود دارند (۱، ۲). شواهد اخیر حاکی از آن است که شاید نانوذرات کلسیفیه همانندساز هستند و این امر می‌تواند یکی از مسایل راجع به کلسیفیکاسیون را حل نماید (۳). نانوباکترها دارای رشد آهسته می‌باشند و در هر محیط استاندارد میکروبیولوژیک قابل رشد نیستند. آن‌ها بدون رنگ و مقاوم به گرما و بیشتر آنتی‌بیوتیک و دارای توانایی فرآوری مواد معدنی هستند.

این میکروارگانیسم‌ها در خون گاو، انسان، ادرار و سنگ‌های کلیه یافت می‌شوند (۴-۶، ۱). همچنین از مجاری صفراوی و سنگ صفرا نیز جدا می‌گردند (۸، ۷). این ذرات در بافت سرطان تخمدان (۹)، سرطان سینه (۱۰) و عروق قلب (۱۱) نیز یافت شده‌اند. تشکیل سنگ در مجاری ادرار یک فرایند چند عاملی است که شاید باعث مستعد کردن ایجاد سنگ گردد. این عوامل شامل عدم تعادل بین شاخص‌هایی مانند ادرار فوق اشباع، نوکلئوتید کریستال و اوره، تجمع و حفظ رشد مداوم کریستال و مهار کننده‌های خود مانند سیترات و گلیکوپروتئین‌های ادرار می‌شود (۱۲)، اما تحقیقات نشان داده است افرادی که دارای سنگ کلیه می‌باشند تنها ۲۰ درصد مواد دارای عوامل مستعد کننده هستند (۱۳). بنابراین می‌توان گفت که عوامل دیگری نیز در ایجاد این رسوبات نقش دارند که از این عوامل، نانوذرات کلسیفیه کننده درصد بالایی از این احتمال را شامل می‌شوند و تحقیقات فراوانی بر روی آن‌ها صورت گرفته است.

تحقیقات در NASA نشان داده است NB در انسان‌هایی که در محیط‌هایی با جاذبه کم زندگی می‌کنند، بیشتر وجود دارد؛ بنابراین از این مشاهدات تلقی می‌شود که NB در فضاوردان باعث افزایش تشکیل سنگ کلیه می‌گردد (۱۵، ۱۴).

قطر سلولی این ذرات نزدیک به ۰/۲ تا ۰/۵ میکرون می‌باشد. معدنی شدن لایه بیرون سلولی، پوشش نگهبان سختی را برای آن‌ها فراهم می‌آورد که تحمل تنش‌های فیزیکی را (که برای دیگر گروه‌های باکتریایی مرگ آور است) ممکن می‌سازد. در نانوذرات پروتئین و پلی‌ساکارید مشاهده می‌شود و یکی از پروتئین‌های اصلی موجود در آن‌ها، مورامیک اسید است که این ماده یکی از ترکیبات اصلی پپتیدوگلیکان باکتری‌ها می‌باشد (۱۷، ۱۶).

مشکل اصلی برای تحقیق بر روی این ذرات، اندازه کوچک آن‌ها می‌باشد که ۱۰ تا ۱۰۰ برابر کوچک‌تر از باکتری‌های شایع است. این امر برای اندازه کوچک آن‌ها بسیار عجیب است که بتوانند یک سلول زنده را درون خود جای داده باشند (۱۸). از طرف دیگر، محققان مختلف به این امر اشاره دارند که اسید نوکلئیک و کانی‌های زیستی در نانوباکترها وجود داشته، می‌توانند توسط میکرومولکول‌های غیر زنده آغاز به همانندسازی کنند (۱۹).

NB با آنتی‌بادی تولید شده بر علیه لیپوپلی‌ساکارید کلامیدیها واکنش متقاطع دارد که این امر باعث می‌شود عده‌ای NB را جزء باکتری‌ها به حساب آورند (۲۰). این ذرات اندازه‌ای بین ۵۰۰-۸۰ نانومتر دارند و بزرگی آن‌ها بستگی به مرحله کلسیفیکاسیون دارد و ذره مرکزی در حدود ۲۰۰-۲۰ نانومتر می‌باشد (۲۱، ۱). رشد نانوباکترها در شرایط هوایی (۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد هوا) بهتر صورت می‌گیرد و مهار کننده‌های سنتز اسیدهای نوکلئیک

جداسازی CNP از نمونه‌ها: ابتدا نمونه سنگ‌ها توسط تجهیزات استریل به صورت دستی شکسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در کلرید هیدروژن یک مولار قرار گرفت. ۱ سی سی هیدروکسید سدیم یک مولار به نمونه‌ها افزوده شد. سپس سنگ‌ها با DMEM شستشو و از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. CNP به دست آمده از سنگ‌های کلیوی و صفراوی بعد از عبور از فیلتر خالص گردید. CNP حاصل شده از رگ‌های آلوده به پلاک‌های آترواسکلروزیس نیز پس از همگن نمودن بافت در سرم فیزیولوژی و عبور از فیلتر، جداسازی و برای کشت در دو محیط DMEM و RPMI استفاده شد.

کشت CNP در محیط DMEM: ۱ سی سی DMEM از محلول عبور یافته از فیلتر در محیط DMEM استریل شده با اشعه گاما حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت ۱۰-۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شد. بعد از ۸-۶ هفته انکوبه کردن، ذرات معلق از فلاسک برداشته، به فلاسک استریل جدید انتقال داده شد و دوباره با شرایط قبلی انکوبه گردید. فلاسک‌ها برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی جمع‌آوری و کف آن‌ها خراش داده شد تا ذرات به طور کامل در محلول شناور شوند، سپس مخلوط سانتریفوژ گردید و رسوبات با آب مقطر (دو بار تقطیر) شستشو داده شد (۱۱).

کشت CNP در محیط RPMI: ۱ سی سی RPMI از محلول عبور یافته از فیلتر در محیط RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد اکسیژن قرار داده شد. بعد از ۴ هفته انکوبه کردن، محلول فوق با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ

مانند ۵- فلورویدوراسیل و سیتوزین آرابینوز از رشد نانوذرات جلوگیری می‌کنند. همچنین تتراسایکلین، تری‌متوپریم و سولفامتاکسازول مانع رشد آن‌ها می‌شود و مهار کننده‌های یونی کلسیم مثل EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) و EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid) از رشد آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند (۲۲، ۲۳).

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی نانوذرات جهت تأیید کشت آن‌ها در محیط‌های کشت مختلف و از آنجایی که به تازگی DNA (Deoxyribonucleic acid) این ذرات در مطالعه‌ای شناسایی شده است (۲۴)، برای تأیید این مسایل و موارد اشاره شده نیاز به مطالعاتی بود تا دیدگاه جدیدی در راه شناسایی این ذرات در ایران فراهم گردد.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی وجود نانوذرات کلسیفیه کننده در سنگ کلیه، سنگ کیسه صفرا و پلاک آترواسکلروزیس به وسیله دو محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و RPMI (Roswell Park Memorial Institute) و بررسی نتایج با روش PCR (Polymerase chain reaction) بود تا دیدگاه جدیدی در راه شناخت بهتر این ذرات و بیماری‌های متأثر از آن‌ها یافت شود.

روش بررسی

تهیه نمونه‌ها: در تحقیق حاضر ۴۴ نمونه شامل ۱۸ سنگ کلیه توسط پزشک اورولوژیست در حین عمل جراحی از بیماران مبتلا به سنگ کلیه، ۱۵ نمونه سنگ کیسه صفرا از اجساد (پزشکی قانونی) و ۱۱ نمونه پلاک آترواسکلروزیس توسط پزشک متخصص قلب و عروق در طی عمل جراحی از افراد مبتلا به گرفتگی عروق و دریچه‌های قلبی جمع‌آوری گردید.

به لوله افزوده، ۱۰ بار وارونه گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی را تخلیه کرده، ۱ میلی لیتر محلول شستشو (اتانول ۷۰ درصد) به لوله اضافه نموده، ۱۰ بار وارونه شد و به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به طور کامل خشک شود. ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به لوله افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا DNA به طور کامل به حالت محلول درآید.

بهینه نمودن تست PCR: پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، تست PCR با استفاده از پرایمرهای 5`AGT CGC TGA CCC TAC CGT GGT TGC3` و 5`ATG CAA GTC GAG CGC CCC GCA AGG 3` Nano-R ویژه ناحیه 16Sr RNA با پروتکل نوشته شده صورت گرفت. واکنش در ۳۵ سیکل به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در دمای ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد (۹).

نتایج

نتایج کشت در دو محیط DMEM و RPMI: پس از ۸ هفته انکوبه کردن محیط‌های کشت، رسوبات سفید در کف فلاسک کشت سلول در هر دو محیط DMEM و RPMI مشاهده گردید. تمام ذرات از لحاظ خصوصیات فنوتیپی با یکدیگر مقایسه شدند و مشخص شد که ذرات در هر نمونه به یکدیگر شباهت زیادی دارند. شکل ظاهری نانوذرات در نمونه‌ها در شکل ۱ و تعداد نتایج مثبت در هر دو محیط در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از جداسازی مواد معدنی از سنگ‌ها به وسیله

گردید. رسوب حاصل به فلاسک استریل جدید منتقل و دوباره با شریط قبلی انکوبه شد. تکرار این فرایند به صورت هر ۱۵ روز یک بار بود. پس از ۶-۸ هفته رسوب حاصل در ته فلاسک برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی جمع آوری گردید و رسوبات قبل از مشاهده با آب مقطر (دو بار تقطیر) شستشو داده شد (۱۹).

میکروگراف میکروسکوپ الکترونی (Scanning

electron microscope یا SEM): رسوبات پس از شستشوی با PBS (Phosphate buffered saline) استریل و آب مقطر، توسط SEM مورد بررسی قرار گرفت. بعد از مشاهده و تأیید نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی و مقایسه آن‌ها با ذرات قبل از کشت مشخص شد که تمام نمونه‌ها با نمونه‌های قبل از کشت هم از نظر شکل و هم از نظر کلنی تشکیل دهنده خود شباهت دارند. پس از تأیید، نمونه‌ها در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۳ بار با آب مقطر در شرایط مشابه شسته شدند. رسوب بر روی لام شیشه‌ای قرار گرفت و توسط هوای خشک ثابت شد. سپس با اضافه نمودن محلول Merk ۱/۲۵ درصد (ساکارز ۴ درصد، در غلظت ۰/۵ مولار و PBS) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. رسوبات پس از شستشو با PBS استریل و آب مقطر، به کمک اتانول و لایه طلا رنگ آمیزی شدند و دوباره توسط SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

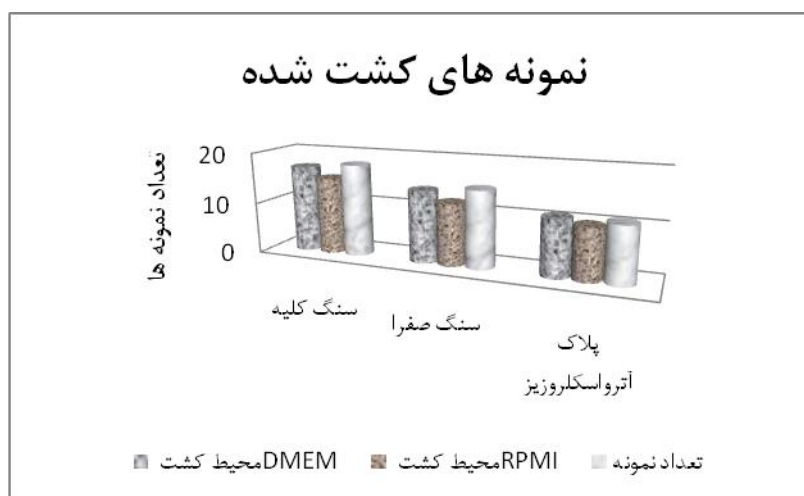
استخراج DNA از CNP: جهت استخراج DNA از

کیت DNP (Cinna Gen, Iran) استفاده شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عبور یافته از فیلتر را به یک لوله اپندورف ۱/۵ منتقل کرده، سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (DNG-plus، سیناژن) به نمونه فوق اضافه و به مدت ۵ ثانیه ورتکس گردید. ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده (ایزوپروپانول)

عامل خودهماندساز مورد تأیید هستند، ولی نمی‌توان به طور قطع گفت که موجود زنده و یا میکروارگانیسم می‌باشند.

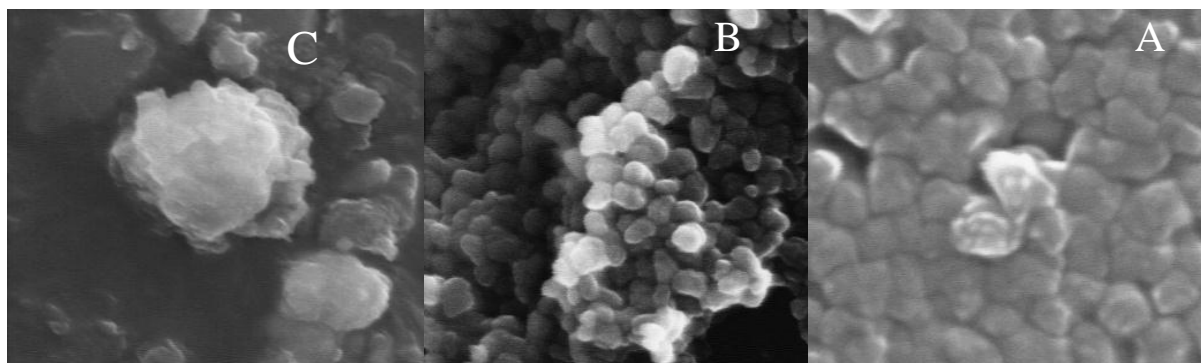
تجزیه و تحلیل از این رسوبات توسط SEM نشان داد که نانوذرات از ۵۰۰ نانومتر یا کمتر در گروه‌بندی کروی، خوشه‌ای و نامتقارن قرار دارند. تصاویر میکروگراف میکروسکوپ الکترونی از نمونه‌های کشت پلاک آترواسکلروزیس (شکل ۲، قسمت A)، سنگ کلیه (شکل ۲، قسمت B) و سنگ کیسه صفرا (شکل ۲، قسمت C) مشاهده می‌شود. محصول PCR در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد و باید در تحقیقات آینده به شناسایی دقیق‌تر این ذرات با توجه به DNA آنها پرداخته شود.

کلرید هیدروژن، ساختارهای کوکسیدی کوچک و خوشه‌ای توسط SEM نیز مشاهده شد. از ۱۸ نمونه سنگ کلیه، ۱۷ نمونه در محیط کشت DMEM و ۱۵ نمونه در محیط کشت RPMI مثبت شدند. از ۱۵ نمونه سنگ کیسه صفرا، ۱۴ نمونه در محیط کشت DMEM و ۱۲ نمونه در محیط کشت RPMI دارای کشت مثبت و در نهایت از ۱۱ نمونه پلاک آترواسکلروزیس، ۱۱ نمونه در محیط کشت DMEM و ۱۰ نمونه در محیط کشت RPMI بعد از ۸ هفته انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مثبت بودند. اعداد حاصل شده بیانگر آن است که در حداکثر میزان، پاسخ مثبت کشت نانوذرات ۹۵ درصد و در حداقل آن برابر با ۸۴ درصد بود. از این درصدها می‌توان چنین نتیجه گرفت که نانوذرات به عنوان یک



شکل ۱. مقایسه نتایج نمونه‌های کشت شده در دو محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) و RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

ستون اول از سمت راست: تعداد کل نمونه‌ها؛ ستون وسط از سمت راست: نتایج کشت مثبت در محیط RPMI و ستون آخر از سمت راست: نتایج کشت مثبت در محیط DMEM



شکل ۲. میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های کشت شده در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

A: SEM تهیه شده از یک نمونه کشت پلاک آترواسکلروزیس، B: SEM تهیه شده از یک نمونه کشت سنگ کلیه و C: SEM تهیه شده از یک نمونه کشت سنگ کیسه صفرا

بحث

یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر حاکی از آن بود که CNP‌های کلسیفیه کننده و خودهماندساز در دریچه قلبی، سنگ‌های کلیه و سنگ صفرا وجود دارند و یکی از عوامل تنگی عروق قلب و ایجاد سنگ‌های کلیه و صفرا می‌باشند. با این حال در ماهیت CNP‌ها اختلاف نظر وجود دارد (۲۵، ۳) و هنوز مشخص نیست که آیا CNP‌ها میکروارگانیزم‌های زنده‌ای هستند و یا تنها ذرات کمیابی می‌باشند که در باکتری‌های دیگر زندگی می‌کنند و نمی‌توان اسید نوکلئیک آن‌ها را با روش‌های متداول تشخیص داد (۲۶، ۱۹، ۲)؛ بنابراین مواد معدنی زیستی منسوب به نانوباکترها ممکن است در ابتدا مولکول‌های غیر زنده باشند و از طریق میکروارگانیزم‌ها انتقال پیدا کنند و خودهماندسازی نمایند (۲).

در حال حاضر شواهد بیوشیمیایی و مولکولی بسیاری برای وجود CNP‌ها یافت شده است که می‌تواند دلیلی برای بودن عوامل عفونی باشد. با توجه به شباهت‌های ساختمانی و نیز تا حدی بررسی وجود 16S rRNA در ساختمان ژنتیکی آن‌ها، عده‌ای CNP‌ها را متعلق به خانواده باکتری‌ها می‌دانند؛

این در حالی است که برخی دیگر با بیان دلایلی از جمله اندازه بسیار کوچک و شرایط کشت ویژه و متمایز از روش‌های متداول میکروبیولوژی، آن‌ها را متعلق به خانواده باکتری‌ها نمی‌دانند (۲۸، ۲۷).

این ذرات حتی برای سال‌ها می‌توانند با تأثیرات سیتوتوکسیک (۱) و با اتصال به آنتی‌بادی‌ها رشد کنند (۲۹، ۲۱، ۱۱، ۹-۷). همچنین مدارک و شواهدی برای وجود DNA و پروتئین در کشت سرم یافت شده است (۳۰، ۲۱، ۱۱، ۹، ۷). این ذرات قابلیت خود همانندسازی دارند و همچنین می‌توان آن‌ها را به صورت ذرات منفرد، توده و یا گروه‌های کوچک جدا نمود (۲۳). مطالعه‌ای نشان داد که CNP‌ها با وجود باکتری‌ها بهتر رشد می‌کنند، این امر که تأکید می‌کند باکتری‌ها می‌توانند به رشد نانوذرات کمک کنند، بسیار مهم است (۳۱).

در مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی سه نوع از رسوبات نانوذرات پرداخت شد که این امر با بررسی دو نوع محیط کشت انجام گردید و همچنین به علت داشتن تنوع در نمونه‌ها و همچنین تعداد نمونه‌های بیشتر توانست نانوذرات را به طور دقیق‌تر نسبت به مطالعات قبلی که فقط دارای یک نوع نمونه و تعداد

Ciftcioglu و همکاران گزارش کردند که درمان ترکیبی با EDTA و همچنین تتراسایکلین در جهت کاهش کلسیفیکاسیون عروق شریانی مؤثر می‌باشد (۳۶). CNPها نیز مدل خوبی جهت استفاده برای واکسن هستند که در حال بررسی و توسعه بیشتر می‌باشند و مسیر احتمالی گوناگونی را برای از بین بردن کلسیفیکاسیون در گیر می‌کنند.

در مطالعه حاضر، وجود CNPها در نمونه سنگ‌های کلیوی و صفرای و همچنین پلاک‌های آترواسکلروزیس به وسیله تصاویر میکروسکوپ الکترونی و همچنین کشت در محیط DMEM و RPMI تأیید شد و نمونه‌ها از نظر شکل و تشکیل توده و ایجاد ساختارها با یکدیگر مقایسه شدند، اما تست PCR موفقیت‌آمیز نبود و وجود DNA نانوذرات با توجه به پرایمرهای به کار رفته تأیید نگردید. این امر می‌تواند دلیلی بر ماهیت ابهام برانگیز این ذرات باشد که نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر وجود نانوذرات کلسیفیه به وسیله روش کشت و مشاهده با میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به مشاهده این ذرات و جداسازی و رشد آنها در محیط‌های کشت متفاوت، می‌توان بیان نمود که یکی از عوامل مؤثر در ایجاد سنگ کلیه، سنگ کیسه صفرا و پلاک‌های آترواسکلروزیس می‌تواند وجود این ذرات باشد که ماهیت آنها هنوز ابهام‌آمیز است. در مطالعات آینده با تأیید وجود DNA در نمونه‌ها به وسیله PCR می‌توان گام مثبتی در تشخیص و تأیید نقش این ذرات در بیماری‌های مختلف در ایران برداشت.

نمونه‌های کم بودند (۲۹)، بررسی کند و آنها را با یکدیگر مقایسه نماید که این امر دیدگاه جدیدی در شناسایی و شناخت بهتر نانوذرات به خصوص در ایران ایجاد می‌کند و باعث انجام تحقیقات کامل‌تر و دقیق‌تر در این زمینه می‌گردد.

Candemir و همکاران، ارتباط CNPها با ایجاد پلاک‌های قلبی را مورد تأیید قرار دادند. آنها وجود آنتی‌بادی بر علیه CNP را در سرم ۹۳ فرد مبتلا به MAP (Mitral annular calcification) مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که تیترا آنتی‌بادی بر علیه CNP در سرم ۷۳ درصد بیماران به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۳۲).

Tulunay و همکاران، ارتباط CNPها با گرفتگی عروق و همچنین وجود آنتی‌بادی بر علیه CNP را در ۱۹۷ بیمار مبتلا به بستگی عروق کرونر مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که CNPها می‌توانند عامل مهمی در ایجاد گرفتگی عروق به حساب آیند (۳۳). Zhang و همکاران ارتباط نانوباکترها را با TM (Testicular microlithiasis) مورد بررسی قرار دادند و برای این منظور از کشت و همچنین توالی‌یابی DNA استفاده نمودند. مطالعه آنها وجود NB را در نمونه‌های سمن این بیماران تأیید کرد. آنها بیان کردند که ابتلا به نانوباکترها می‌تواند یکی از علل ابتلا به TM باشد (۳۴).

در مطالعه Simonetti و همکاران، وجود نانوباکترها در نمونه‌های سنگ کلیه به وسیله دو روش کشت و PCR مورد بررسی قرار گرفت که در ۶۹ درصد از نمونه‌ها، بایوفیلم دیده شد و وجود نانوپارتیکل‌ها نیز به وسیله تصاویر میکروسکوپ SEM مورد تأیید قرار گرفت. در مطالعه آنها هیچ محصول PCR مشاهده نشد (۳۵).

References

1. Kajander EO, 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): 8274-9.
2. Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, Swaim W, Hu L, Kopecko DJ. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(21): 11511-5.
3. Miller VM, Lieske JC, Salahudeen AK. Introduction to pathologic calcification: crystallization, infection, or cellular transdifferentiation. *J Investig Med* 2006; 54(7): 365-6.
4. Bjorklund M, Ciftcioglu N, Kajander EO. Extraordinary survival of nanobacteria under extreme conditions. *SPIE* 1998; 3441: 123-9.
5. Kajander EO, Kuronen I, Akerman KK, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *SPIE* 1997; 3111: 420-8.
6. Ciftcioglu N, Pelttari A, Kajander EO. Extraordinary growth phases of nanobacteria isolated from mammalian blood. *SPIE* 1997; 3111: 429-35.
7. Wang L, Shen W, Wen J, An X, Cao L, Wang B. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria. *Dig Dis Sci* 2006; 51(6): 1126-32.
8. Wen Y, Li YG, Yang ZL, Wang XJ, Wei H, Liu W, et al. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(5): 421-4.
9. Hudelist G, Singer CF, Kubista E, Manavi M, Mueller R, Pischinger K, et al. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization. *Histopathology* 2004; 45(6): 633-7.
10. Altundag K, Altundag O, Akyurek S, Atik MA. Possible association between nanobacteria and malignant microcalcifications in breast cancer. *Breast J* 2006; 12(3): 287.
11. Miller VM, Rodgers G, Charlesworth JA, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, et al. Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(3): H1115-H1124.
12. Miller NL, Evan AP, Lingeman JE. Pathogenesis of renal calculi. *Urol Clin North Am* 2007; 34(3): 295-313.
13. Vella M, Karydi M, Coraci G, Oriti R, Melloni D. Pathophysiology and clinical aspects of urinary lithiasis. *Urol Int* 2007; 79(Suppl 1): 26-31.
14. Ciftcioglu N, Haddad RS, Golden DC, Morrison DR, McKay DS. A potential cause for kidney stone formation during space flights: enhanced growth of nanobacteria in microgravity. *Kidney Int* 2005; 67(2): 483-91.
15. Jones JA, Ciftcioglu N, Schmid JF, Barr YR, Griffith D. Calcifying nanoparticles (nanobacteria): an additional potential factor for urolithiasis in space flight crews. *Urology* 2009; 73(1): 210-3.
16. Miyoshi T, Iwatsuki T, Naganuma T. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(2): 1084-8.
17. Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-

- mediated isothermal amplification products. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(4): 1195-8.
18. Psenner R, Loferer M. Nanobacteria: size limits and evidence. *Science* 1997; 276(5320): 1776-7.
 19. Drancourt M, Jacomo V, Lepidi H, Lechevallier E, Grisoni V, Coulange C, et al. Attempted isolation of Nanobacterium sp. microorganisms from upper urinary tract stones. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 368-72.
 20. Steering Group for the Workshop on Size Limits of Very Small Microorganisms. Size limits of very small microorganisms. Washington, DC: National Academies Press; 1999. p. 39-84.
 21. Kajander EO, Ciftcioglu N, Aho K, Garcia-Cuerpo E. Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urol Res* 2003; 31(2): 47-54.
 22. Khullar M, Sharma SK, Singh SK, Bajwa P, Shiekh FA, Relan V, et al. Morphological and immunological characteristics of nanobacteria from human renal stones of a north Indian population. *Urol Res* 2004; 32(3): 190-5.
 23. Lieske JC, Kumar V, Farrell-Baril G, Yu S, Charlesworth JE, Rzewuska-Lech E, et al. Detection and propagation of calcified nanostructures from human aneurysms. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43(5): 13A.
 24. Lu H, Guo YN, Liu SN, Zhang DC. Nanobacteria may be linked to calcification in placenta. *Ultrastruct Pathol* 2012; 36(3): 160-5.
 25. Ciftcioglu N, McKay DS, Mathew G, Kajander EO. Nanobacteria: fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Investig Med* 2006; 54(7): 385-94.
 26. Benzerara K, Miller VM, Barell G, Kumar V, Miot J, Brown GE, Jr., et al. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft x-ray spectromicroscopy. *J Investig Med* 2006; 54(7): 367-79.
 27. Zhou HD, Li GY, Yang YX, Li XL, Sheng SR, Zhang WL, et al. Intracellular colocalization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. *Mol Immunol* 2006; 43(11): 1864-71.
 28. Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. *Pathophysiology* 2004; 11(2): 95-101.
 29. Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(8): 5023-8.
 30. Bratos-Perez MA, Sanchez PL, Garcia de CS, Villacorta E, Palacios IF, Fernandez-Fernandez JM, 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.
 31. Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Poxton IR, Kajander EO, Ciftcioglu N, Jones ML, et al. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2000; 57(6): 2360-74.
 32. Candemir B, Ertas FS, Kaya CT, Ozdol C, Hasan T, Akan OA, et al. Association between antibodies against calcifying

- nanoparticles and mitral annular calcification. *J Heart Valve Dis* 2010; 19(6): 745-52.
33. Tulunay KC, Sinan EF, Hasan T, Candemir B, Ozdol C, Arikan AO, et al. Anticalcifying nanoparticle antibody titer is an independent risk factor for coronary artery calcification. *Coron Artery Dis* 2011; 22(6): 394-400.
34. Zhang QH, Lu GS, Shen XC, Zhou ZS, Fang Q, Zhang X, et al. Nanobacteria may be linked to testicular microlithiasis in infertility. *J Androl* 2010; 31(2): 121-5.
35. Simonetti AB, da Ros CT, de David C, Campos K, Behar PRP, Ribeiro E, et al. Occurrence of nanobacteria-like particles in renal stones of a southern Brazilian population. *Open Journal of Urology* 2012; 2: 1-5.
36. Ciftcioglu N, Vejdani K, Lee O, Mathew G, Aho KM, Kajander EO, et al. Association between Randall's plaque and calcifying nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2008; 3(1): 105-15.

A Survey on the Presence of Calcifying Nanoparticles in Renal Stones, Gallbladder Stones and Atherosclerosis Plaque

Izadi A., B.Sc.^{1*}, Moslemi E., Ph.D.²

1. Young Researcher Centre, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding author; E-mail: amir_izad@yahoo.com

(Received: 17 May 2013

Accepted: 20 Nov. 2013)

Abstract

Background & Aims: Calcifying nanoparticles are different forms of calcium and phosphate in sediments. Recent evidence suggests that calcifying nanoparticles (CNPs) are probably self-replicating. Several diseases are linked to nano-bacteria including kidney stones, gallbladder stone, cardiovascular plaques, oral–dental plaque, many cancers, and autoimmune diseases. The aim of this study was to assess the presence of nano-bacteria in kidney stones, gallbladder stones, and atherosclerosis plaques and compare them with each other in terms of structural form.

Methods: In this study, 18 samples of kidney stones, 15 gallbladder stones, and 11 samples of atherosclerosis plaque, taken by surgeons during surgery, were collected. After isolation of nano-bacteria (NB) from the sample and confirmation by scanning electron microscope (SEM), some of the samples were cultured in a solution of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing fetal bovine serum (FBS) 10% and glutamate at 37 °C with 5% CO₂ and 95% air for 8 weeks. Deoxyribonucleic acid (DNA) extraction protocol was performed in all samples. After that, they were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) techniques.

Results: 17 cases out of 18 kidney stone samples were culture positive. Moreover, 14 cases out of 15 gallbladder stone samples and all 11 samples of atherosclerosis plaque were culture positive. Growth and the presence of CNPs were confirmed in all cases by SEM. PCR testing was performed for all samples; however, no DNA samples were detected with the primers used.

Conclusion: According to the results, the presence of calcifying nanoparticles using culture methods, and observation using scanning electron microscope were confirmed. However, the existence of nucleic acid has not been confirmed in this study. Thus, more research using PCR must be performed to prove their existence. Therefore, we can say that one of the important factors in the development of kidney stones, gallbladder stones, and atherosclerosis plaques is the presence of microorganisms.

Keywords: Calcifying nanoparticles, Culture, Polymerase chain reaction (PCR)