

## NANOBAKTERİ : YENİ BİR BAKTERİ TÜRÜ MÜ ?

### NANOBACTERIA: A NEW BACTERIAL GENUS ?

Serpil KAYA<sup>1</sup> Kemal KAYA<sup>2</sup>

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas

<sup>1</sup> Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup> Üroloji Anabilim Dalı

**Anahtar Sözcükler:** Nanobakteri, taş oluşumu, böbrek taşları

**Key Words:** Nanobacteria, stone formation, kidney calculi

## ÖZET

"Son yıllarda "Nanobakteri" olarak adlandırılan yeni bir bakteri türü ile ilgili yapılan çalışmalar büyük ilgi çekmektedir. Bu konuyu dünya gündemine taşıyan Kajander isimli araştırmacının böbrek taşları ile nanobakteriler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışması , tüm dünyada heyecan yaratmış ve bu konuda çeşitli çalışmaların başlamasına neden olmuştur. "Nanobakteri" terimi otonomik olarak çoğalabilen ve karbonat apatit oluşturabilen çok küçük partiküller (0.2 µm) için kullanılmaktadır. Yapılan incelemelerde bu bakterilerin rutin mikrobiyolojik besiyerlerinde üreyemedikleri, bakteriyolojik boyalarla kolaylıkla boyanamadıkları ve fikse edilemedikleri, tüm hücre kültürlerinde ise üreyebildikleri bildirilmektedir. Bu bakteri Proteobakterilerin α-2 alt grubunda yer almakta ve üremeleri immün yöntemler, ELISA, optik dansite, mikroskopik sayım gibi yöntemlerle saptanmaktadır. Nanobakterilerin tanısında Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri (DMEM), transmisyon ve scanning elektron mikroskopları kullanılmaktadır. Nanobakteriler insanlarda kan, böbrek ve dental pulpa taşlarından, ayrıca hayvan serumları ve hücre kültürlerinden izole edilmişlerdir. Buna karşılık, bir grup araştırmacı ise nanobakterilerin varlığının henüz kanıtlanmadığını ve böyle bir bakteri türünün olmadığını bildirerek bu çalışmalara karşı çıkmaktadırlar.

## SUMMARY

Studies on a new bacterium "Nanobacteria" cause great interest. Kajander et al. discovered this bacterium and their study on the relationship of Nanobacteria and kidney calculi introduced this topic to world's attention. "Nanobacteria" term is used to identify very tiny particles (0.2 µm) replicating autonomously and forming carbonate apatite. It is reported that nanobacteria can not be cultured in common microbiological media, but can grow in mammalian cell cultures. The bacterium can not be stained with bacteriological dyes and can not be fixed. Nanobacteria has been assigned to the α-2 subgroup of Proteobacteria. Their growth can be identified with immune staining, ELISA, optic density and microscobic counting. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), transmission and scanning electron microscopes are being used to detect nanobacteria. The bacteria are isolated from human blood, kidney and dental pulp stones and also from animal blood and cell cultures. But there is a group of researchers criticizing these studies and refusing the existence of nanobacteria.

"Nanobakteri" terimi biyolojide otonomik olarak çoğalabilen ve karbonat-apatit maddesi oluşturabilen çok küçük partiküller (0.2 nm) için, jeolojide ise kaya ve mineral yüzeylerinde scanning elektron mikroskobu ile saptanan küresel yapıdaki partiküller için kullanılmaktadır. Mars'tan gelen bir meteorun üzerinde de benzer yapıların gözlenmesi, nanobakterilerin primitif hayatın öncülleri olup olmadığı sorusunu gündeme taşımıştır .

İlk kez Kajander ve ark. (1), memeli hücre kültürleri ile ilgili çalışmaları sırasında bu bakterilerle karşılaşmışlardır. Memeli hücreleri steril olarak kabul edilir, ancak çoğu zaman virüs ve mikoplazmalarla kontamine olup fetal sığır serumlu (FSS) besiyerinde üreyebilirler. Kajander ve arkadaşları, hücre kültüründeki kontaminasyonun nedenlerini araştırırken memeli hücre kültürlerini incelemek için transmisyon elektron mikroskobunu (TEM) kullanmışlardır. Bu inceleme sırasında virus veya mikoplazmalarla karşılaşmamış, ancak hücrelerin çoğunda çok ufak bakterilerin bulunduğunu görmüşler, kültürdeki tüm maddeleri gama-radyasyon yöntemi ile incelediklerinde ise bu ufak bakterilerin kaynağının ticari olarak steril ifadesi taşıyan FSS olduğunu saptamışlardır. Kajander, 50 nm'lik filtrelerden geçemeyen ancak, 100 nm'lik filtrelerden geçebilen bu yeni mikroorganizmalar için "nanobakteri" terimini kullanmıştır (1).

Kajander ve ark. (1), nanobakterilerin 50-500 nm. boyutlarında ve küresel yapıda olduğunu bildirmiştir. Bakterilerin çevrelerinde onları kimyasal maddelere ve ısıya karşı oldukça dayanıklı hale getiren belirgin bir hidroksi-apatit kılıfının olduğu bildirilmiştir. Bu kılıfın, kültürlerde çok kalın bir kalsifiye hücre zarfı oluşturarak bakteri boyutlarını arttırdığı, böylece bu bakterileri ışık mikroskobunda görülebilir hale getirdiği belirtilmiştir. Yapılan incelemede bu bakterilerin yaygın olarak kullanılan mikrobiyolojik besiyerlerinde üreyemediği, ancak hücre kültürlerinin tümünde üreyebildiği, bakteriyolojik boyalarla kolaylıkla boyanamadıkları ve fikse edilemedikleri saptanmıştır (1).

Bu bakterilerin spesifik bir immun yanıt oluşumunu başlatabildikleri, özgül antikorlarla boyanabildikleri; ELISA, optik dansite, mikroskobik sayım, SDS-PAGE veya metionin ve üridin tutulumuyla üremenin saptanabildiği bildirilmiştir. Bu üremenin, yüksek doz aminoglikozit grubu antibiyotikler, EDTA, sitozin-arabinozid ve gama-radyasyon ile önlenemediği belirlenmiştir. Nanobakterilerin 16S rRNA gen sekanslama yöntemi ile yapılan çalışmalarda, *Brucella* ve *Bartonella* türlerinin de içinde bulunduğu Proteobakterilerin a-2 alt grubunda yer alması gerektiği; *Brucella* ve *Bartonella* türleri ile ortak bazı antijenleri paylaştıkları, konakta hücre içi ve dışı yerleşimlerinin bulunduğu ve sitopatik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (2, 3).

Nanobakterilerin kültürde üretilmeleri için, Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri (DMEM) kullanılmış, bu besiyerine %10 FSS eklenmiş ve standart hücre kültür ortamında inkübe edilmiştir (37°C, %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortam) Nanobakteri örneklerinin ekiminden önce 0.2 nm'lik filtreden geçirilmesi gerekir. Subkültürünün yapılması için ise içinde FSS bulunmayan gama-radyasyondan geçirilmiş DMEM besiyeri kullanılmış, daha sonra transmisyon ve scanning elektron mikroskopları ile incelemeler yapılmıştır (4).

İnokülasyondan bir hafta sonra ışık mikroskobu ile incelendiğinde, kok yapısında çok ufak partiküller görülmüş ve üreme zamanları üç gün olarak saptanmıştır. Bunların boyutları zamanla artmış ve iki ay sonunda, beyaz renkte bir biyofilm tabaka içinde çıplak gözle görülebilir hale gelmiştir. DNA boyanması sadece modifiye yöntemle yapılabilen, koyun kanlı agarda üremeyen, anti-nano-bakteriyel monoklonal antikorların kullanıldığı indirekt immun floresans yöntemi ile pozitif sonuç veren, tipik kok yapısındaki partiküllerin görülmesi durumunda, kültürde nanobakteri tanısının konulabileceği bildirilmiştir. Bu bakteriler kültür şişesinin alt yüzeyine yapışmış halde olup konkav bir yüzey şeklinde "mağara benzeri" apatit yapı oluşturmuşlardır. Nanobakterilerin biyofilm tabakada hareketsiz kaldıkları ve yavaş işleyen bir süreçte kemiksi bir yapı haline dönüştükleri bildirilmiştir (5).

Nanobakterilerin hücre kültürlerinin en yaygın kontaminantlarından oldukları ve %80'in üzerinde FSS'lerden izole edildikleri bildirilmiştir. Nanobakteriler kültür ve immunoassay yöntemleri ile insan ve inekten (6), ayrıca böbrek ve dental pulpa taşları ile dış yüzeyinden de izole edilmişlerdir (4).

Nanobakteriler patojenik bakterilerle biyofilm tabaka oluşturma ve kalın koruyucu bir kapsüle sahip olma gibi ortak bazı özelliklere sahip olup birçok memeli hücresi tarafından hücre içine alındıkları ve hücre içine alındıklarında sitotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (2).

Nanobakterilerin tavşanlara injekte edildiklerinde ilk önce idrardan, bir yıl sonra ise beyin-omurilik sıvısından izole edildiği, ayrıca laboratuvar hayvanları ve insanlarda kronik enfeksiyona neden olabileceği bildirilmiştir İnsanlarda, *M. leprae* ve *Brucella* enfeksiyonlarında görülenlere benzer şekilde oto-immün bozukluklara yol açabileceğinden de söz edilmiştir. (7). Sterilizasyon yöntemleri ile yok edilemediklerinden, hücre kültüründe hazırlanmış aşı, gama globulin veya diğer antikor preparatlarında nanobakteriler bulunabilmektedir. Bu ürünler, nanobakteri açısından potansiyel bir tehlike olarak kabul edilmelidir.

Böbrek ve üriner sistem taşlarında nanobakterilerin küresel depozitler halinde bulunabileceği öne sürülmüş-

tür (8-10). Çiftçioğlu ve ark. (8) ile diğer araştırmacıların çalışmalarında, nanobakterilerin nidus oluşturarak böbrek taşı oluşturmaya ile ilişkili kuramlar şu şekilde açıklanmaktadır:

- a) İnceledikleri böbrek taşlarının %97.2 sinde nanobakterileri izole etmişlerdir (8).
- b) Böbrek taşlarının büyük bir çoğunluğu apatit bileşeni içermektedir (11).
- c) Nanobakteriler böbrekte biriken ve insan vücudunda apatit oluşturduğu bilinen tek mikro organizmadır (12).
- d) İnsan böbrek taşlarından izole edilen nanobakteriler kültür ortamında da taş oluşturmuşlardır (8).
- e) Nanobakteriler *in vitro* olarak memeli hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olan ve böbrek dokusunda apoptozise yol açan bir mikroorganizmadır (7).

Çiftçioğlu ve ark. (3)'nün çalışmasında; böbrek taşı oluşumu ile nanobakteri arasındaki ilişki, *Helicobacter pylori* ile peptik ülser arasındaki ilişkiye benzer bulunmuştur. Her iki hastalığında temelde bir bakteri enfeksiyonu ile başladığı ve hastalığın ilerleme evresinde ise endojen ve diyetel faktörlerin rol oynadığı bildirilmiştir.

Kajander ve ark. (1), tekrarlayan böbrek taşı hastalığında antibiyotik kullanımının olası yararlarını gündeme getirmişlerdir. Kalın mineral kılıflarından dolayı nanobakteriler birçok antibiyotiğe dirençlidir. Ancak, tetrasiklinin apatit yapı üzerine birikerek bakteriyositatik etkiye sahip olduğu ve *in vitro* deneylerle de etkinliğinin kanıtlandığı bildirilmiştir (1).

Vücuttaki çeşitli dokularda açıklanamayan kalsiyum çökmeleri oluşmakta ve nanobakterilerin de bu oluşumdan sorumlu olabileceği öne sürülmektedir (13, 14). İskelet dışı kalsifikasyonların olduğu bazı hastalıklar, dental pulpa taşları, bazı safra kesesi taşları, ateroskleroz, skleroderma, kalsifik tendinit ve artrit ile diğer taş hastalıkları, bazı malignensi ve demanslar, hemodiyaliz hastalarında gözlenen yaygın metastatik kalsifikasyonlar nanobakterilerle ilişkisi araştırılan hastalıklardır.

#### Nanobakterilerin varolmadığına dair görüşler

Açıkladıkları bu bilgiler nedeni ile Kajander ve arkadaşları, etik olmayan teoriler geliştirmekle ve çalıştıkları partiküllerin biyolojik yapısı ile ilgili temeli aydınlatmadan

önce diğer araştırmacıları çalışma yapmaya yönlendirmekle suçlanmışlardır. Çalışmalarının sonuçlarının olası bir kontaminasyona bağlı olabileceği gibi, kültür ortamının kristalizasyonu nedeni ile veya deneysel planlama ya da yorum hatasına bağlı olabileceği bildirilmiştir. Kajander ise, standart biyolojik testlerin nanobakteriler için uygun olmadığını belirterek bu iddiaları reddetmiştir (15).

Turku Üniversitesi'nde bir mikolog olan Jouni Issakainen partiküllerin bağımsız ve eleştirel olarak değerlendirilmeden epidemiyolojik çalışmaların yapılmaması gerektiğini bildirmiştir. Aynı kişi, Kajander'in kendi teorisini desteklemek amacıyla, elektron mikroskop görüntüleri ve diğer morfolojik kanıtlar arasında seçim yaptığını, hatta küçük bakterilere benzeyecek yapılar oluşturmak üzere teknik oyunlar bile kullanmış olabileceğini belirtmiştir (15). Kajander'in nanobakteri DNA'sını tanımladığını bildiren yayınlarına karşılık (5), Issakainen bu çalışmada kontrollerin gösterilmediğini, reaksiyon zamanı ve büyüklüğünün artırılarak DNA boyasının konsantrasyonunun artırıldığını ve boyanmanın non-spesifik olduğunu bildirerek buna karşı çıkmıştır (15).

Kajander'in böbrek taşları ile nanobakterilerin ilişkisi üzerinde yaptıkları çalışmalar konuyu dünya gündemine taşımış, bu çalışmalar özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde bazı araştırma gruplarında heyecan yaratmış ve bu konuda çalışmalara başlanmıştır. Illinois Üniversitesi'nden Hjelle ve ark. (16) polikistik böbreklerde nanobakterilerin üreyip (4); bölünebildiklerine ait morfolojik kanıtlar olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise, FSS, insan tükrüğü ve dental plak örneklerinden nanobakterilerin kültürlerinin başarıyla yapılmış olduğu, ancak bu kültürlerin moleküler ve mikrobiyolojik özelliklerinin incelenmesinde hiçbir canlı varlık kanıtına rastlanmadığı belirtilmiş, nanobakteriye bağlı olduğu belirtilen biyomineralizasyonun, cansız biyolojik makromoleküllerin ve apatitin kendisinin çekirdek oluşturucu etkisine bağlı olarak oluşabileceği eklenmiştir.

Bu konuda henüz bir netlik olmadığı ve nanobakterilerin varlığı henüz kanıtlanmadığı halde bu konuda birçok çalışma yapılmakta, böylece tartışmalara neden olmaktadır. Hangi tarafın haklı olduğu, bilimsel çalışmalar ışığında zamanla meydana çıkacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Kajander EO, Kuronen I, Akerman K, Peltari A, Çiftçioğlu N. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth. *Proc SPIE* 1997; 3111: 420-8.
2. Kajander EO, Çiftçioğlu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intracellular and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8274-9.
3. Çiftçioğlu N, Kajander EO. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology* 1998; 4: 259-70.

4. **Cisar JO, Xu DQ, Thompson J, et al.** An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *Proc Natl Acad Sci* **2000**; 97: 11511-5.
5. **Çiftçioğlu N, Kuronen I, Akerman K, Hiltunen E, Laukkanen J, Kajander EO.** A new potential threat in antigen and antibody product Nanobacteria. *In: Brown F, Burton D, Doherty P, Mekalanos J, Norrby E, eds. Vaccines.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**: 99-103.
6. **Breitschwerdt EB, Sontakke S, Cannedy A, et al.** Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Caroline beef herd. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 879-82.
7. **Akerman K, Kuikka JT, Çiftçioğlu N, et al.** Radiolabeling and *in vivo* distribution of nanobacteria in rabbit. *Proc SPIE* **1997**; 3111: 436-42.
8. **Çiftçioğlu N, Pelttari A, Kajander EO.** Extraordinary growth phases of nanobacteria isolated from mammalian blood. *Proc SPIE* **1997**; 3111: 429-35.
9. **Vogel G.** Bacteria to blame for kidney stones? *Science* **1998**; 281: 153.
10. **Chan DY, Jarrett TW, Kavoussi LR, et al.** Nanobacteria: Possible role in human calculi disease. *J Urol* **1999**; 163 (Suppl 4): 249.
11. **Day M.** Hard little bugs could cause everything from tumours to dementia. *New Scientist* **1998**; 11: 11.
12. **Mandel N.** Mechanism of stone formation. *Semin Nephrol* **1996**; 16: 364-74.
13. **Çiftçioğlu N, Björklund M, Kourikoski K, Bergstrom K, Kajander EO.** Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int.* **1999**; 56: 1893-8.
14. **Carson D.** An infectious origin of extraskeletal calcification. *Proc Nat Acad Sci* **1998**; 95: 7846-7.
15. **Abbott A.** Battle lines drawn between 'nanobacteria' researches. *Nature* **1999**; 401: 105.
16. **Hjelle T, Miller Hjelle M, Poxton I, et al.** Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. *Kidney Int* **2000**; 57: 2360-74.