

# Нанобактерии – жизнь или угроза жизни?

Разнообразие жизни на нашей планете не перестает поражать воображение. В разных частях земного шара до сих пор находят неизвестные науке живые существа. Совсем недавно американские ученые сообщили об открытии совершенно новой формы жизни, которую невозможно отнести ни к одному из до сих пор известных видов живых существ. Данное открытие может в корне перевернуть представление современной медицинской науки об этиологии и патогенезе целых групп заболеваний, начиная от атеросклероза и злокачественных опухолей и заканчивая мочекаменной болезнью. Речь идет о нанобактериях (НБ).

## Этиологическая и патогенетическая роль НБ при мочекаменной болезни

→ НБ играют важную роль в развитии уrolитиаза. Особенностью данных микроорганизмов является способность формировать очаги кристаллизации кальция фосфата с образованием минералов и повреждением уротелия собирательных трубочек и почечных сопочков.

НБ, названная так в соответствии с ее малыми размерами, впервые была обнаружена в 1988 г. геологом Техасского университета (США) Робертом Фольком при исследованиях минералов горячих сернистых источников в окрестностях г. Рима. С использованием электронной микроскопии Р. Фольк исследовал «картину» обнаруженных бактерий овоидной и призматической форм, размножающихся в неорганическом мире. НБ оказались покрыты оболочкой карбонатного апатита – своеобразной средой обитания, благодаря которой микроорганизм не только защищен от влияния окружающей среды, но длительное время был недоступен для бактериологических исследований. Финский биолог Олави Кайандер, работавший с клеточными культурами, неожиданно столкнулся с серьезной проблемой: часто выращиваемая им культура переставала расти и погибала. При этом

внутри погибающих клеток О. Кайандер установил существование необычных «пузырьков» в несколько долей микрон. При выяснении причин апоптоза ученый обнаружил в фильтрате культуры странную бактерию, размеры которой были в пределах от 0,2-0,5 до 2 микрон, заключенную в каменную скорлупу. Этой бактерией оказалась НБ (рис. 1, 2).

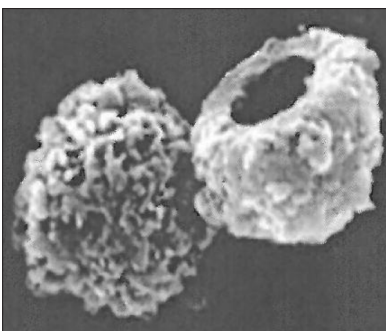


Рис. 1. Электронная микрофотография двух образований около 2 микрон в диаметре, названных НБ

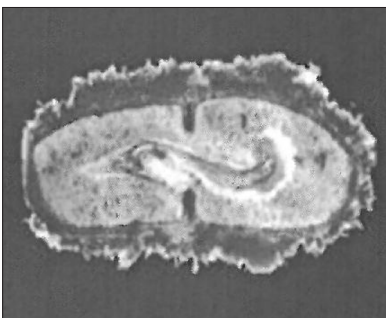
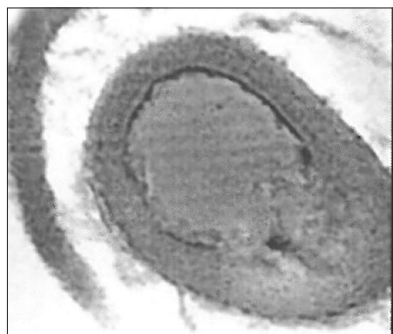


Рис. 2. НБ, покрытая кристаллами апатита, в стадии деления

В 1996 г. Р. Фольк и О. Кайандер обнаружили присутствие окаменевшей НБ на марсианском метеорите, упавшем на Землю более 2 млн лет назад, что послужило основанием для пересмотра существующих теорий о происхождении жизни на нашей планете и признания НБ в качестве «космического начала» органической жизни на Земле. НБ были обнаружены и как загрязняющие агенты клеточных культур. Стандартные микробиологические методы были неэффективны для выявления этих микроорганизмов, поскольку, как оказалось, последние размножаются в культуре клеток и не растут на стандартных питательных средах. Позже выяснилось, что НБ растут на средах DMEM или RPMI-1640, не нуждаясь в сывороточных добавках для роста. Характерной особенностью НБ оказалось их размножение внутри сформированных тонких полостей из апатитного слоя. В старых культурах при исследовании с помощью электронной микроскопии выявляются колонии НБ с минерализованными стенками в виде блоков (конгломератов), состоящих преимущественно из карбонатного апатита. Эти конгломераты могут увеличиваться в размере, давать отсевы, соединяться вместе, формируя камни, видимые невооруженным глазом. Рост минерала имеет место в виде



**Рис. 3. НБ, обнаруженная внутри частично растворенного почечного камня**

концентрированных слоев нанокристаллов апатита с прерыванием в виде пористых структур (рис. 3).

Частота обнаружения НБ колеблется в широких пределах. К примеру, в Финляндии было проведено исследование, в результате которого

было определено наличие НБ-антигена в сыворотке крови у 5% взрослых пациентов. По результатам исследования, проведенного в Швеции, выявлено, что у 14% здоровых доноров есть антитела к этому агенту. Более того, препараты гамма-глобулина, приготовленные из плазмы здоровых добровольцев (n=1000), содержат НБ-антитела. При некоторых заболеваниях, таких как атеросклероз, или состояниях, требующих проведения гемодиализа, НБ-антитела и НБ-антигены могут быть обнаружены в крови или моче в большинстве случаев.

Последующие исследования выявили, что примерно 80% сывороток, которые выпускают различные фармакологические компании, позитивны

в отношении НБ и в них имеет место рост минералообразующих агентов, диаметр которых составляет 80-500 нм, как и на дентальных отложениях. НБ были обнаружены в сыворотке крови и моче при проведении исследований у большого количества людей. Согласно различным данным, НБ были получены из сыворотки крови, мочи, мочевых камней, дентальных камней и ряда мягких тканей. НБ хорошо размножаются в искусственной моче. Апатитные образования в почечных камнях и культуре НБ имеют очень похожее строение (рис. 4).

Общая характеристика НБ по результатам исследования стандарта strain (SeraLab 901045) представлена в таблице.

**Таблица. Общая характеристика НБ**

Морфология	• Грамнегативные, фильтрующиеся (размер пор 0,22 мкм), бактериоподобные частицы с различным количеством покрытия из карбонатного апатита
	• Диаметр единичных НБ колеблется в пределах 80-500 нм
	• НБ локализуются в центральной полости, окруженной апатитными отложениями; в среде с низким содержанием питательных веществ НБ имеют тенденцию формировать колонии, окруженные тонким покрытием кальция апатитом; кальцифицированные колонии могут достигать размеров более 1 мм
	• Остаются жизнеспособными при температуре 90 °С в течение 1 ч, устойчивы к дозе радиации 15 кГр и 5% раствору NaCl
Рост и метаболизм	• Сывороточные формы размножаются около 3 дней
	• Свободные сывороточные формы удваивают свою популяцию каждые 6 дней
	• Метаболизм в 10 тыс. раз медленнее, чем у E. coli
	• Инкорпорируют уредин и метионин в ДНК и белок соответственно
	• Лучше растут в аэробных условиях (5% CO <sub>2</sub> и 95% воздуха)
	• Рост НБ подавляют ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот (5-фторурацил, цитозина арабинозид и др., а также тетрациклин при терапевтической концентрации в сыворотке крови, триметоприм, сульфаметоксазол, нитрофурантоин, ампициллин и аминогликозиды)
	• In vitro рост НБ ингибирует цитрат и бисфосфонаты
Структура	• НБ содержат более 30 протеинов
	• Главным компонентом бактериальных пептидогликанов является мурамициновая кислота
Определение	• Моноклональные антитела к белкам и пептидогликанам НБ, а также моноклональные антитела к хламидийным липополисахаридам позволяют распознавать интактные НБ
Клеточные эффекты	• Некоторые изоляты НБ проявляют цитотоксичность на клетки млекопитающих in vitro, проникая внутрь путем эндоцитоза
	• В эксперименте на мышах доказано, что внутривенное введение НБ приводит к экскреции их в мочу

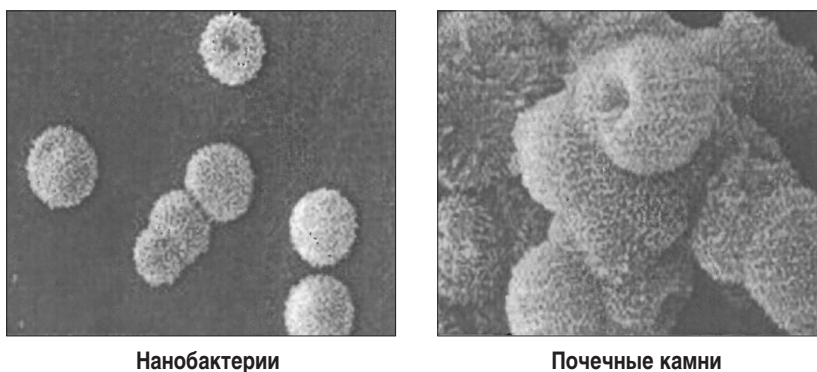


Рис. 4. Апатитные образования в почечных камнях и культуре НБ

Одним из важных методов обнаружения НБ является электронная трансмиссивная микроскопия, позволяющая выявлять НБ в виде темных частиц вследствие покрытия их апатитом. Наличие НБ может быть выявлено после обработки 2% уранилацетатом. Наиболее высокий процент положительных находок отмечается при микроскопии после инкубации с коллоидным золотом, покрытым НБ-антителами с последующим отмыванием и высушиванием. Антитела определяются как тонкое покрытие на поверхности НБ. Поскольку структурным компонентом НБ является покрытие из апатита, которое делает их видимыми, нет необходимости в фиксации перед электронной микроскопией. Теория НБ-зависимого формирования камней основывается на обнаружении НБ в почечных камнях, обнаружении подобных форм НБ в культуре из почечных камней, формировании кальциевых камней НБ *in vitro* в почках после НБ-инъекции в почки кролика. НБ способны продуцировать камнеобразующие колонии, содержащие интра- и экстрацеллюлярные кальциевые депозиты, повреждая клетки и различные клеточные культуры. Важным является дозозависимое формирование почечных камней, которое наблюдается через 1 мес после инъекции НБ в почку кролика транслумбальной чрезкожной пункцией. На экспериментальных

животных показано формирование камней после введения НБ в почку, а сами НБ признаны нефротропными. У НБ обнаружена способность к адгезии, инвазии и повреждению клеток собирательных трубочек и зоны сосочков почек. Предположение о вовлечении НБ в формирование почечных камней подтверждают наблюдения Carr и Randall (рис. 5).

Фрагменты, описанные Carr, в почечных лимфатических протоках и собирательных трубочках были в виде маленьких отполированных депозитов кальция фосфата. Кальция

фосфат индуцировал формирование гетерогенной нуклеации кальция оксалата в зоне собирательных трубочек и ниже, являясь фактором риска образования бляшек Рандалла. Рандалл описал кальцийсодержащие бляшки в почечных сосочках. Согласно его гипотезе, формирование почечных камней начинается с этих бляшек вследствие образования первичных тканевых повреждений. В результате экспериментов с клеточными культурами выявили активные процессы вовлечения кристаллов кальция оксалата в клетки культуры, этот процесс является активным и очень важным для формирования камней.

Множество почечных камней имеет внутренний сфероид, состоящий из апатита. НБ, которые выделены из сфероидных частиц, состоящих из апатита, в условиях *in vitro* формируют частицы с подобной архитектурой. Крошечные нанокристаллы имеют высокоорганизованную структуру, подобную наносферической, которую обнаруживают в жемчуге и других кальцийкарбонатных образованиях в живых

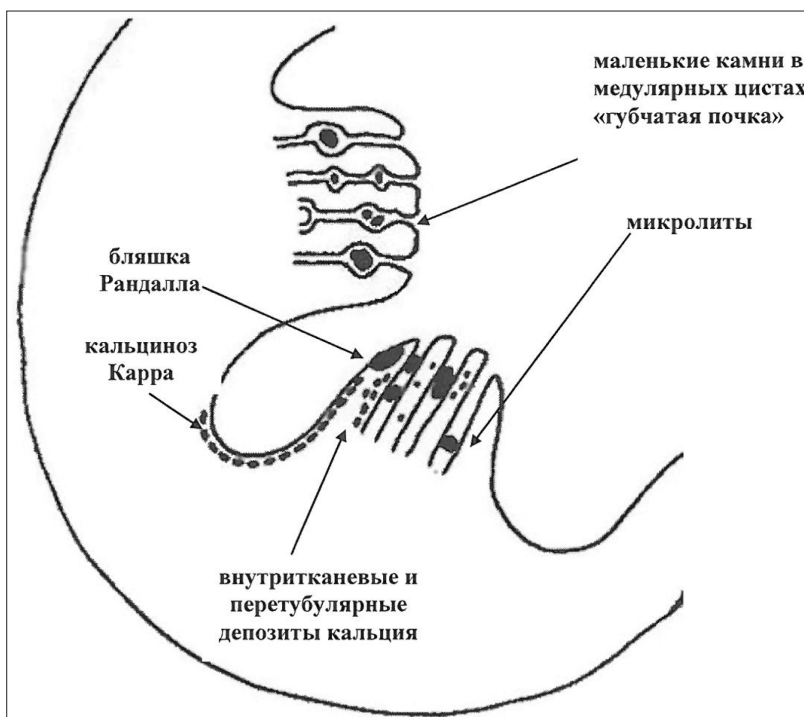


Рис. 5. Различные типы тканевых преципитатов в почке

организмах, что предполагает протеиноопосредованный механизм минерального роста. С помощью уранилацетатной пробы установлено, что процесс биоминерализации НБ имеет место внутри слизисто-белкового матрикса, окружающего НБ. Следовательно, нанокристаллы апатита формируются на слизисто-белковой поверхности НБ. Кристаллурия приводит к образованию мочевых ионных конгломератов у камнеобразователей вследствие наличия активных очагов патологической кристаллизации или слабости ингибиторов кристаллизации. НБ транспортируют очаги кристаллизации апатита из крови в ткань почек и мочу. Активная роль НБ в кристаллизации может объяснять процессы, о которых говорилось выше.

Биоминерализация – это специфический процесс. Формирование апатита *in vitro* останавливается только тогда, когда уровень кальция снижается до 50% (с 1,8 ммоль до 0,9 ммоль), а уровень фосфата падает, примерно, до нуля. Присутствующие НБ могут использовать доломит как источник кальция для образования апатита и продолжения процесса биоминерализации. НБ-индуцированная биоминерали-

зация является кислородозависимым процессом. Гаммаизлучение в дозах, предупреждающих репликацию НБ, прекращает и биоминерализацию. Процесс биоминерализации подавляется некоторыми антибиотиками и антиметаболитами, которые имеют нанобактерицидный эффект в терапевтических концентрациях. Свет низкой интенсивности (без термического эффекта), наоборот, стимулирует репликацию НБ и формирование камней из апатита. Наличие минерального комплекса макромолекулярного кальция фосфата вызывает кальцификацию не только в почках, но и кровеносных сосудах, формируя атеросклероз. Введение ингибиторов белковой кальцификации этидроната способствует исчезновению протеинминерального комплекса через 24 ч после инъекции препарата. Таким образом, ингибирование костной минерализации этидронатом свидетельствует, что происхождение высокомолекулярного минерально-белкового комплекса, содержащего фосфат кальция в сыворотке, обусловлено НБ. Предполагается, что лечение бисфосфонатами, хелатными агентами или некоторыми антибиотиками приводит к элиминации или разрушению этих комплексов. Применение

бисфосфонатов и хелатных агентов по отдельности или вместе с антибиотиками может быть эффективно как при лечении патологической кальцификации у пациентов, у которых формируются камни, так и при терапии атеросклероза.

Диагностика НБ методом анализа ДНК затруднена из-за отсутствия возможности выделить нуклеиновые кислоты вследствие апатитного покрытия НБ.

Несмотря на противоречивость различных публикаций, являются ли НБ аутокатализаторами минеральных агрегатов или саморазмножающимися биологическими частицами, их следует рассматривать как инфекционные агенты, которые могут быть вовлечены в патологические процессы кальцификации.

Таким образом, в настоящее время достаточно данных, чтобы считать НБ ренотропными, вызывающими нуклеацию и рост кристаллов апатита, инициируя почечную патологию путем повреждения тубулярного эпителия, биоминерализацией и, возможно, тубулярной обструкцией и хронической инфекцией, которая в результате приводит к нарушению тканевой репарации и формированию камня. ■

## Новое об известном

### Экстракт горькой дыни замедляет рост раковых клеток молочной железы

Согласно результатам недавнего исследования, экстракт китайской горькой дыни оказывает существенное влияние на рост раковых клеток молочной железы и со временем может стать профилактическим средством для борьбы с этой формой рака. «Наши результаты показывают, что экстракт горькой дыни модулирует несколько сигнальных путей, вовлеченных в процесс гибели раковых клеток молочной железы, – заявил профессор Ратна Рэй из отделения патологии университета г. Сент-Луиса (США). – Этот экстракт может быть использован для профилактики рака молочной железы».

Используя человеческие клетки рака молочной железы, Р. Рэй и его коллеги обнаружили, что экстракт китайской горькой дыни значительно сокращает пролиферацию и индуцирует гибель указанных клеток.

В настоящее время продолжается изучение антипролиферативного действия экстракта этого растения, также запланировано проведение доклинических исследований для оценки химиопрофилактической эффективности экстракта китайской горькой дыни при пероральном применении.

<http://cancerres.aacrjournals.org/>