

*Opšti pregledi*  
*General reviews*

**Correspondence to:**

Dr. Mirjana Pavlović, MD, PhD, Research Professor, Charles Schmidt College of Sciences, Dept. of Computer Science and Engineering, Room: # 457, 777 Glades Road, Boca Raton, FL, 33431, USA

Pmirjana@aol.com  
mpavlovi@fau.edu

BIOMINERALIZACIJA I NANOBakterIJA :  
NA PRAGU NOVOG KONCEPTA?

BIOMINERALISATION AND  
NANOBACTERIA: OPENING THE DOOR TO  
THE NEW CONCEPT?

Mirjana Pavlović,  
Charles Schmidt College of Sciences, Florida Atlantic University,

*Ključne reči*

Biom mineralizacija, nanobakterija,  
kalcifikacija, hidroksiapatit,  
imunološki efekti

*Key words*

Biom mineralisation, nanobacteria, cal-  
cification, hydroxyapatite, immuno-  
logical effect

*Abstract*

Recent evidence suggests a role for nanobacteria in a growing number of human diseases, including renal stone formation, cardiovascular diseases, and cancer. This large body of research studies promotes the view that nanobacteria are not only alive but that they are associated with disease pathogenesis. However, it is still unclear whether they represent novel life forms, overlooked nanometer-size bacteria, or some other primitive self-replicating microorganisms. Some authors report that CaCO<sub>3</sub> precipitates prepared in vitro are remarkably similar to purported nanobacteria in terms of their uniformly sized, membrane-delineated vesicular shapes, with cellular division-like formations and aggregations in the form of colonies. The gradual appearance of nanobacteria-like particles in incubated human serum as well as the changes seen with their size and shape can be influenced and explained by introducing varying levels of CO<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub> as well as other conditions known to influence the precipitation of CaCO<sub>3</sub>. Western blotting reveals that the monoclonal antibodies, claimed to be specific for nanobacteria, react both with bacterial proteins and with serum albumin. However, nanobacteria-like particles obtained from human blood have certain characteristics that can precisely distinguish them from conventional bacteria. It is more and more obvious that nanobacteria could be a part of life from other planets (Mars), immunologically not proactive due to their hydroxyapatite shell which holds them apart of the attack of immune system. A group of researchers claim to find the cure for the biological calcification caused by this interesting entity. Further research will reveal whether they are definitely alive or not.

*UVOD*

U poslednjih desetak godina od objavljivanja prvih radova o nanobakteriji (1-4), izrazitog otpora u naučnoj javnosti i uporne kritike koncepta koji otvara moguće postojanje tog novog mikro-entiteta, prikupljeno je toliko materijala da se u svakom slučaju može otvoriti ozbiljna diskusija o tome. Finski naučnik Olavi Kajander i njegov asistent iz Turske, mikrobiolog, Dr Neva Ciftcioglu objavili su 1997. i 1998. radove u kojima ukazuju na eventualno postojanje novog mikroorganizma, nazvanog "nanobakterija" (NB) (1-2), verovatno uključenog u proces biomineralizacije, tj. impregnacije ćelija i tkiva solima kalcijuma i fosfata (ekstraosealna kalcifikacija). Ovo je dovelo do velikog nesporazuma na području kauzalne patologije niza oboljenja: od kancera (prvenstveno ovarijuma i prostate) preko ateroskleroze, do stvaranja kamena u šupljim organima (žučna kesa, bubreg).

U protekloj deceniji, pojavio se niz dokaza poteklih iz istraživačkog rada različitih autora ( 5-13 ) koji podupiru egzistenciju ovog neobičnog entiteta. No, još uvek u naučnoj javnosti nije jednoglasno prihvaćeno postojanje tog novog mikro-entiteta kao živog organizma (14). Uprkos negativizmu, i rezistentnoj isključivosti istaknutih pojedinaca, skupljene su činjenice, sumirane u Tabeli 1. koje nedvosmisleno ukazuju na sličnosti i razlike između nanobakterije i običnih bakterija.

Iz tabele 1 se vidi da je nanobakterija po veličini toliko mala da se ne može videti optičkim mikroskopom. Stoga su

elektronski mikroskop (transmisioni - TEM i skenirajući - SEM) glavna "oruđa" za njihovu detekciju a čitav niz fizičko-hemijskih metoda: difrakcija x-zraka, infracrvena mikroskopija, fluorescentno bojenje na DNA (Hoechst), ugradnja radioaktivnog uridina, fluorescentno bojenje antitelima na proteinski antigen nanobakterije i t.d. strateški pristupi za dokazivanje njihovog postojanja, života, rasta i razmnožavanja. Primenom ovih metoda pokazalo se da je nanobakterija oko 10 000 puta manja od bakterija regularne veličine, replicira se 1000 - 10 000 puta sporije i raste u humanom i goveđem sistemu - krvi (Nanobacterium Sanguineum).

Nanobakterija kolonizuje krv domaćina i luči "biofilm" oko sebe koji postepeno stvara čvršći omotač od kalcijum-hidroksiapatita koji je potpuno obavija (1-2). Bakterija njime fizički zaštićuje svoj "imunogeni" (proteinski i DNA) sadržaj i imitira poznati sistemski entitet koji "nudi" imunom sistemu domaćina na prepoznavanje. No, upravo to ih čini imunološki irelevantnim za imuni sistem domaćina jer on prepoznaje hidroksiapatit kao deo molekularne građe sopstvene kosti (a ne strani molekul). Stoga se smatra da su nanobakterije implicirane u uzroke patološke kalcifikacije u humanim sistemima i organima koja progredira s godinama (starenjem) i s kojom nismo rođeni. Takođe se smatra da nanobakterije uzrokuju i neke forme kancera i apoptoze - ćelijske programirane smrti, posto je kalcijum jedna od neophodnih komponenti za kaskadu tog procesa. Iz svih ovih razloga, istraživanja vezana za lek za eradikaciju nanobakterije su u toku (10, 13).

Tabela 1. Nanobakterija u poređenju s "običnim" bakterijama

OSOBIINA	NANOBAKTERIJA	OBIČNA BAKTERIJA
Kultivisanje	Samo u medijumu za ćelijsku kulturu	
Medijum za ćelijsku kulturu	+	+
Bakteriološki medijum	-	+
Vreme obnavljanja (deobe)	1-3 dana	Minuti do sati
Tipična veličina	0.1-0.5 um	1-2 um
Formiranje apatita	+	-
Temperatura, gama-zraci	Termofilna, rezistentna na Gamma-iradijaciju	Max.rast do 32C o, Gama sensitivna
Prisutnost u krvi, rast	Prisutna u krvi, spor rast	Prisutna u podlogama i biljkama, brz rast
Mineralizacija i ultrastruktura	Mineralizuje, jedinstvena ultrastruktura	Ne mineralizuje, Gram pozitivna - poznata ultrastruktura
Polimeri	Bez polimera, 'cadaverin-like' jedinjenja	Prisutni normalni polimeri
Baze nukleinskih kiselina	Modifikovane-prisutne	Normalne komponente nukleinskih kiselina
Proteinski "pattern"	Specifični proteinski članovi, sekvence, epitopi	Specifični proteinski članovi, sekvence, epitopi
Porin protein	Samo slaba ukrštena reakcija	Samo slaba ukrštena reakcija
PCR	Potrebna specijalan protokol	Standardni protokol primenjiv

### IZMEĐU STVARNOSTI I FANTAZIJE

Postoje indicije da su nanobakterije nađene u uzorcima prašine donete sa Marsa, kao i nekih meteora palih na zemlju i da su stoga od šireg značaja za čovekovo shvatanje sveta. Istraživanja koja podupire NASA pokazala su da se u većine astronauta ispoljila generalizovana pojava kamenaca u bubregu i žučnoj kesi i kalcifikacija aorte i aortnih zalistaka (1, 2, 6), kao i progredijentna ateroskleroza sa ranim znacima starenja (1, 2, 10). Izgleda da se nanobakterije brže razmnožavaju u bestežinskom stanju (13) što baca veo na pogled u budućnost, ukoliko se ne deluje radikalnom prevencijom. Na osnovu radova nekih istraživača (Miller, Jelić, Cisar) izgleda da su nanobakterije nađene u plakama desni, aterosklerotičnim pločama, zubnom kamencu, bubrežnom kamencu, biopsijama lupusnog panikulitisa, psamomima ovarijalnih tumora i kalcifikatima kancera prostate (5-13). Premda uslovi i metode istraživanja kao i uslovi unutar samih sličnih metoda variraju, ove se činjenice moraju do kraja ispitati i svesti na zajednički imenitelj. Potpuna definicija nanobakterije i njenih mogućih uticaja na humani organizam dala bi odgovor na mnoga pitanja i otvorila neka nova.

### SADAŠNJE STANJE PROBLEMA

Produkcija hidroksiapatita (biogenog apatita) koju su uočili Kajander i Ciftcioglu 1997-1998 od strane rastućih nanobakterija dokazana je primenom energetske disperzione x-zračne mikroanalize i hemijskih analiza, dok je Furijeovom transformacijom pri primeni infracrvene spektroskopije (FTIR) pokazano da je to hidroksiapatitni molekul (1-2). U fibroblastima inficiranim nanobakterijom, TEM je otkrila ekstracelularne

kristalne depozite koji se boje po von Kossa-i i podsećaju na kalcisferule nađene u uzorcima patološke kalcifikacije (1, 2, 6).

Kajander ističe da su prethodni modeli formiranja kamena vodili hipotezi o lokalno povišenom pH (znatno iznad fiziološkog) i s tim u vezi aktivnostima enzima ureaze i alkalne fosfataze (ALP), kao litogenim faktorima (faktorima stvaranja kamena). Ovo je potkrepljeno brojnim hemijskim dokazima, u koje se uplela i teorija slobodnih radikala, kao doprinosnog činoca za oštećenje ćelijskih membrana i membrana organa i tkiva (2), što bi sve skupa vodilo ostvarivanju uslova za deponovanje kalcijuma-kalcifikaciji. Veoma uređen matematičko-fiziko-hemijski sistem fundamentalnih nauka se duboko opire konceptualno kompleksnom mikrobiološkom sistemu upravo na imunološkom nivou, ključnim pitanjem: Kako bakterija može da živi i razmnožava se u organizmu domaćina a da je imuni sistem ne detektuje i napadne? Izgleda da je ovaj deo, čak i u slučaju navedenog potencijalnog odgovora, za hemičare i fizičare "jadac" koji se još uvek ne može prihvatiti bez polemike (4). Nasuprot tome, rezultati rada na nanobakteriji ukazuju da se kalcijumapatit može formirati bez navedenih enzima, pri blago alkalnom, fiziološkom pH od 7.4 i fiziološkim koncentracijama kalcijuma i fosfata, uko-

liko su prisutne nanobakterije koje mogu da produkuju apatit u medijumu, koji mimicira tkivnu tečnost, (što znači i glomerularni filtrat), kreirajući tako jedinstveni biološki model za kalcifikaciju (Slika 1).

Ipak, mi ne razumemo kompletno kontrolne mehanizme biomineralizacije niti u primitivnim, a ni u razvijenim organizmima. Uslovi depozicije apatita u mekim tkivima diskutovani su decenijama ali još ostaju spekulativni.

Danas znamo da se kalcifikacija koronarnih arterija javlja uglavnom isključivo na mestima aterosklerotičnih lezija (6, 7, 8, 9). Kalcifikacija u razvoju ovih plaka je komplikovan, aktivno regulisan proces mineralizacije sličan modeliranju i remodeliranju kosti. Mineralozi objašnjavaju da je sve što za to treba: formiranje kristalnog nukleusa i sredina s dovoljno rastvorenih potrebnih komponenti blizu koncentracije zasićenja ili jednake njoj sa odsustvom inhibitora formiranja kristala (13). Bakterije ili drugi agensi koji produkuju takav nukleus (ako su prisutni u krvi) su veliki kandidati za početak i ubrzanje patološke kalcifikacije in vivo. Ovo je klinički značajno zbog fosfata koji su u krvi blizu nivoa zasićenja. Tačan mehanizam kojim se apatit formira oko nanobakterije - nepoznat je.

Ukratko, nanobakterija je savršen model za proučavanje biogene mineralizacije/kalcifikacije jer je:

1. sposobna za samoobnavljanje, a nema komplikovane metaboličke puteve
2. akumulira kalcijum i fosfat pod fiziološkim uslovima
3. produkuje kalcijum-fosfatni mineral sličan kosti
4. egzistira u fiziološkim uslovima (pH, gravitacija, temperatura)
5. lako ju je manipulirati i replicirati za fiziološki model

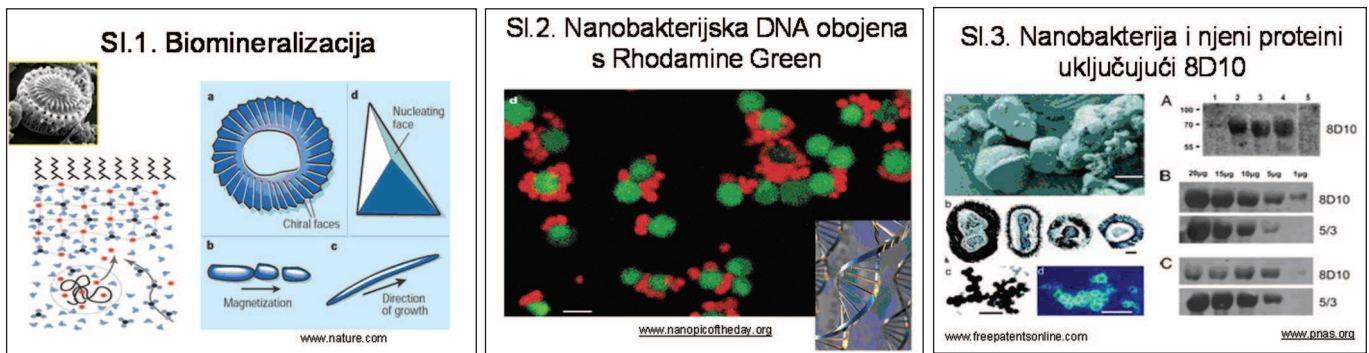
Ipak, još uvek postoje kontroverze s kojima se nije lako nositi i na čiju provokaciju treba spremati odgovore iz naučne prakse (14).

Na pitanje da li su ove partikule žive, odgovor bi poticao još iz starog rada Manilof-a (4) u kome je pokazao da ćelije moraju biti bar 140 nm u prečniku da bi sadržale DNA i proteine potrebne za funkciju ćelije, iako pojedini veći ćelijski organizmi pod specifičnim uslovima mogu da smanje svoju veličinu ispod tog ograničenja, smežuravanjem koje ne dovodi do smrti (4). DNA nanobakterija je nedavno otkrivena i definisana (Slika 2). Potom, nanobakterije pokazuju visoku rezistenciju na toplotu i druge metode koje ubijaju živo uključujući ultravioletnu svetlost, što neke navodi na pomisao da je to pre kristal, nego živi organizam. Ipak, osetljive su na antimikrobske agense naročito antibiotike tetraciklinskog spektra (10, 13). I konačno, Cisar (6) je u svom radu od 2000. godine predložio alternativnu interpretaciju biomineralizacije: prvenstveno pripisana

1) antitelo na nanobakteriju (0.86 NU; ref.interval 0.61-1.3 se smatra pozitivnim) i

2) NB antigen 324.8 NU (ref.interval 0.0-2.9 Nu - negativno i >3.0 Nu - pozitivno) (10).

Eksperimenti su pokazali da se NB izlučuje iz tela mokraćom i njeno rasipanje odatle u atmosferu i stratosferu izgleda sasvim neizbežno. Ipak, naučnici još uvek polemisu o tome da li bi pojava NB u oblacima mogla da igra ključnu ulogu u rasipanju i širenju infektivnog agensa, a možda čak i u nukleaciji kapljica poteklih iz oblaka Ovo se događa zato što NB, ponesena sa zemaljskog tla vetrom, može da prođe između visoko-vlažnih regiona oblaka i relativno suve inter-oblačne zone, vodeći oscilacijama između dormantnog i aktivnog stanja. Ostaci lepljivog proteina koji prekriva bakterije, stvarani u samom početku pre čvrsto formiranog apatitnog "oklopa" čine da one deluju kao ekstremno efektan nukleus kondenzacije, sa tendencijom agregacije u grozdove nakon kontakta. Širenje



nanobakteriji, možda je početno injicirana neživim makromolekulima i prenesena na "subkulturu" pomoću samo-propagirajućeg mikrokristalnog apatita. Ipak, biomineralizacija u medijumu za kulturu je "pečat" rasta nanobakterije. Ovo je nesumnjivo pokazano u radu sa radioaktivno obeleženom bakterijom (8) i drugom, obeleženom antitelom na nanobakterijske proteine (9) zvanim 8D10 antitelo čime se postigla enumeracija partikula i povećao kredibilitet o samoobnavljanju bakterija u kulturi koji je nedostajao u prvim Kajanderovim radovima (1-2). Zapaženo je nekoliko proteina pri ekstrakciji materijala iz kultivisanih, dekalcifikovanih nanopartikula stavljenih na SDS-PAGE elektroforezu (Slika 3). Međutim, monoklonsko antitelo 8D10 prepoznaje jednu jedinu traku oko 50 kDa u Western Blot analizi, (WB) i stoga je ubedljivo specifično. Fluorescentno obeleženo korisno je i za prikazivanje nanobakterija u tkivima (Slika 4). Nedavno je razvijen ELISA test za dokazivanje tog proteinskog antigena bakterije, kojim se može utvrditi i rast NB (Nanopuncture ELISA kit).

### ERADIKACIJA NB IZ ORGANIZMA

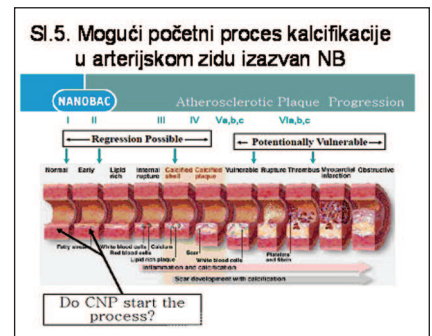
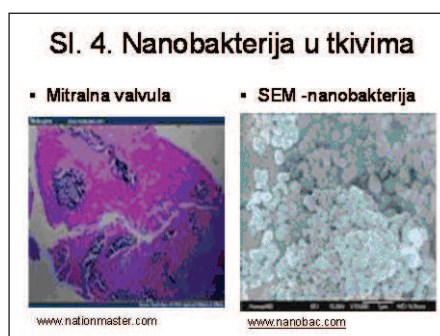
Uprkos skepticizmu izgleda da se sa više dokaza koji podupiru gledište da su aktivne a specijalno da mogu biti uključene u nekoliko ozbiljnih oboljenja (formiranje bubrežnih kamenaca, neki slučajevi u spektru aterosklerotičnog sindroma, (Slika 5) srčana oboljenja i neki tumori - ovarijuma i prostate najpre, kao i lupusni paniculitis) NB polako prepoznaju kao takve u naučnoj zajednici.

Proizveden je dijagnostički kit za dokazivanje nanobakterije u krvi i kulturi, što olakšava problem lokalizacije i detekcije (10,13). Dokazuju se:

infekcije bi stoga trebalo sprečiti na jednom obimnijem planu, pogodnim aerosolom, (nanosprej) a na individualnom planu postoje lekovi za eradikaciju infekcije efikasni u većoj ili manjoj meri.

Tetraciklinski antibiotici ubijaju bakterije, ali se bolest nakon određenog vremena ponavlja. Pored toga, tetraciklinski preparati izgleda da pomažu poboljšanje nekih aspekata oboljenja, dok drugih ne. Tako je u jedne bolesnice došlo do poboljšanja simptoma angine pectoris, ali ne i lupusnih simptoma (kalcifikacija sinovija). U drugom slučaju su tetraciklinski preparati pomogli kod lupusnog panikulitisa (13). To znači da treba ili smanjiti osetljivost na NB infekciju ili naći efikasniji lek, ili pak obezbediti specifičnu (vakcinacionu) prevenciju kad se jednom NB potpuno upozna. Tema tetraciklinskih antibiotika kao leka zastupljena je i u najnovijem pristupu firme NANOBAC Lifesciences, Tampa, Florida, u postupku zvanom Com ET, kojim se preporučuje 500 mg tetraciklina dnevno, uz odgovarajuću ishranu i jednu EDTA supozitoriju dnevno. Tretman se pokazao efikasnim kod hroničnog prostatitisa.

Očigledno da je potreban progres u našem znanju o nanobakteriji da bi se došlo do najefikasnijeg preventivnog i kurativnog koncepta.



## REZIME I ZAKLJUČCI

Nanopartikule udružene s precipitacijom kalcijum-karbonata prvi put su otkrivene od strane geologa u prirodnim depozitima toplih izvora Italije (Viterbo, Lazino) i nazvane tako prema njihovoj maloj veličini (0.03-0.3 um). Slične strukture su izolovane iz humane krvi, mokraće, tečnosti bubrežnih cisti, bubrežnih kamenaca, aterosklerotičnih plaka, lupusnog panikulitisa, psamomskih tela ovarijalnog kancera i kalcifikata prostate, sugerišući da ove strukture mogu doprineti kalcificirajućoj bolesti humane vrste. Stoga je hipotetisano da su to bakterije na nanometarskoj skali - 'nano(n)bacteria'.

Nanopartikule iz geoloških uzoraka, međutim, petrificiraju sa kalcijum-karbonatom, silica-om, gvožđe-sulfidom i kompleksiraju sa silikatima i fosfatom. S druge strane, nanopartikule izolovane iz sisarskih bubrežnih kamenaca su inkapsulirane hidroksiapatitom, kalcijevim mineralom nadenim u aterosklerotičnom tkivu i kosti. Jasno je stoga da rešenje ovog pitanja zahteva zajednički rad eksperata iz bioloških, medicinskih i geoloških nauka da bi se jasno razdvojila i u humanoj patologiji definisala tri moguća ali ne i neizbežno međusobno isključujuća mehanizma patološke kalcifikacije:

1. Proces koji povlači i utiče na neorgansku kristalizaciju
2. Mehanizam kojim ćelije posreduju kristalizaciju, uključujući ćelijsku transformaciju
3. Dokazi za prisustvo kalcificirajućih nanopartikula unutar obolelih humanih organa

Neki autori saopštavaju da  $\text{CaCO}_3$  precipitati pripremljeni in vitro imaju znatne sličnosti sa nanobakterijama u smislu njihove uniformne veličine, membranom-ograničenog vezikularnog izgleda sa celularnim formacijama koje liče na deobne skupine agregirajući u formi kolonija (14). Postepena pojava partikula nalik-nanobakterijama u inkubiranom humanom serumu, kao i promene uočene u njihovoj veličini i obliku, mogu biti manipulisane i objašnjene uvođenjem različitih nivoa  $\text{CO}_2$  i  $\text{NaHCO}_3$  kao i uslova poznatih da utiču na precipitaciju  $\text{CaCO}_3$  (14). Western blotting otkriva da monoklonska antitela inače specifična za nanobakterije takođe reaguju i sa serum albuminom (14). Međutim, ove "nanobacteria-like" partikule dobijene iz humane krvi imaju izvesne karakteristike koje ih mogu precizno demarkirati od konvencionalnih bakterija.

Interesantno bi bilo ustanoviti da li NB postoje u biljkama, posebno s aspekta da neka biljna hrana favorizuje nastanak kamenaca u bubregu i žuči. I konačno, potrebno je razmotriti s teorijske i praktične strane komplementarne koncepte nanopartikula kao nukleusa za biomineralizaciju i nanopartikula kao nanoorganizama (NB). Nadamo se da će nove ideje i diskusije doprineti obrazovanju novih kolaborativnih timova da bi se povećalo znanje o patologiji kalcifikacije, nezavisno od toga da li je to jedna jedina teorija ili su to paralelni procesi koji vode zajedničkoj krajnjoj tački (ishodištu), a mogu voditi i novoj dijagnostici i tretmanima.

## Apstrakt

Noviji podaci ukazuju na ulogu nanobakterija u rastućem broju humanih oboljenja uključujući bubrežne kamence, kardiovaskularna oboljenja, i kancer. Ove obimne istraživačke studije promovišu gledište da je nanobakterija ne samo živa već i povezana sa patogenezom oboljenja. Međutim, još uvek je nejasno da li ovaj entitet predstavlja novi oblik života, ranije previdenu kategoriju bakterija nanometarske veličine, ili neke sasvim druge primitivne mikroorganizme s osobinom samoobnavljanja.

Neki autori saopštavaju da  $\text{CaCO}_3$  precipitati pripremljeni in vitro imaju znatne sličnosti sa nanobakterijama u smislu njihove uniformne veličine, membranom-ograničenog vezikularnog izgleda sa celularnim formacijama koje liče na deobne skupine agregirajući u formi kolonija. Postepena pojava partikula nalik-nanobakterijama u inkubiranom humanom serumu, kao i promene uočene u njihovoj veličini i obliku, mogu biti manipulisane i objašnjene uvođenjem različitih nivoa  $\text{CO}_2$  i  $\text{NaHCO}_3$  kao i uslova poznatih da utiču na precipitaciju  $\text{CaCO}_3$ . Western blotting otkriva da monoklonska antitela inače specifična za nanobakterije takođe reaguju i sa serum albuminom. Međutim, ove "nanobacteria-like" partikule dobijene iz humane krvi imaju izvesne karakteristike koje ih mogu precizno demarkirati od konvencionalnih bakterija. Sve je jasnije da bi nanobakterija mogla biti deo života s drugih planeta (Mars), neaktivna imunološki zbog svog hidroksiapatitnog omotača koji ih drži zastićene od napada imunog sistema. Jedna grupa istraživača tvrdi da je našla terapijski tretman za biološku kalcifikaciju uslovljenu ovim interesantnim entitetom. Buduća istraživanja će otkriti jesu li nanopartikule definitivno žive ili ne.

## LITERATURA

1. Kajander EO, Kuronen I, Akerman KK, Pelttari A, and Ciftcioglu N: *Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously recirculating agent on Earth*. SPIE 3111: 420-428, 1997
2. Kajander EO and Ciftcioglu N. *Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra and extracellular calcification and stone formation*. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 8274-82-79, 1998
3. Maniloff J: *Nanobacteria: size limits and evidence (Letter)*. Science, 276; 1776-1777, 1997
4. Kerr RA. *Requiem for life on Mars? Support for microbes fades*. Science 282 : 1398-1400, 1998
5. Ciftcioglu N, Borklund M, Kuorikoski K, Bergstrom K and Kajander OE: *Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation*. Kidney Internatl, 56: 1893-1898, 1999
6. Cisar JO, De-Qui Xu, Thompson J, Swaim W, Hu L, and Kopecko DJ: *AN alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralisation*. PNAS, 97, 21: 11511-11515, 2000
7. Jelic TM, Chang HH, Roque R, Malas AM, Warren SG, Sommer AP: *Nanobacteria-associated calcific aortic valve stenosis*. J Heart Valve Dis. 16, 1: 101-105, 2007
8. Miller MV, Rodgers G, Charlesworth J, Kirkland B, Severson SR, Rasmussen TE, Yagubyan M, Rodgers JC, Cockerill FR, Folk RL, Rzewuska-Leh E, Kumar V, Farrell-Barill G and Lieske JC: *Evidence of nanobacterial-like structures in calcified human arteries and cardiac valves*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H1115-H1124, 2004
9. Miller VM, Lieske JC, and Salahudeen AK: *Introduction to pathologic calcification: crystalization, infection, or cellular transdifferentiation*. J Investing Med. 54, 7:365-6, 2006
10. Ciftcioglu N, Mc Kay DS, Mathew G and Kajander OE: *Nanobacteria: Fact or Fiction? Characteristics, Detection, and Medical Importance of Novel Self-Replicating, Calcifying Nanoparticles*. Journal Invest Med 54:385-394, 2004
11. Goldfarb DS: *Microorganism and calcium oxalate stone disease*. Nephron Physiol, 98, 2: 48-54, 2004
12. Wang XJ, Liu W, Yang ZL, Wei H, Wen Y, Li YG: *The detection of nanobacteria infection in serum of healthy Chinese people*. Zonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi: 6: 492-4, 2004
13. Keating P. Doctoral Thesis, part II: *Causitive aspects of lupus*. Florida Atlantic University, 2007
14. Martel J and Young JD-E: *Purported nanobacteria in human blood as calcium-carbonate nanoparticles*. PNAS, 105, 14: 6649-5554, 2008