

## Bacterial ghosts and their applications in biomedicine

Aghil Bahramian, Saeed Khoshnoud, Hossein Goudarzi, Mehdi Goudarzi\*

Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2015/03/19    Accept: 2015/10/4)

### Abstract

**Background:** The Bacterial Ghost (BG) are cell envelopes derived from Gram-negative bacteria, which contains all of elements of cells surface; except cytoplasmic content. Now days according to high prevalence incidence rate of cancer in the world and common use of chemotherapy as a common treatment; and its side effects; existence of a carrier for targeted transmission of chemotherapy drugs to cancerous cells is necessary. This review study was performed in order to investigate the bacterial ghosts and their applications in biomedicine. In current study from published articles between 1990 and 2015 and databases such as PubMed, Sciences Direct and Google Scholar was used. Search by keywords

Bacterial ghost, vaccine and gene therapy according to Medical Subject Headings (MeSH) was performed. Finally, 46 articles were included in our study. The results of this survey exhibited that use of bacterial ghosts in biomedicine was relatively desired. Therefore, bacterial ghosts are able to induce stimulation and reinforcement of immune system against microbial pathogens. On the other hand, bacterial ghosts lead to enhancement of drug absorption, transfer and also dissemination of drug in target tissue.

**Keywords:** Bacterial Ghost, vaccine, gene therapy

\* Corresponding authors: Dr. Mehdi Goudarzi, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: gudarzim@yahoo.com

## شیخ باکتریایی و کاربردهای آن‌ها در بیومدیسین

عقیل بهرامیان، سعید خشنود، حسین گودرزی، مهدی گودرزی\*

گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۱۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷

### چکیده

**سابقه و هدف:** شیخ باکتریایی (*Bacterial Ghost*) پوشش سلولی به دست آمده از باکتری‌های گرم منفی است که فاقد محتویات سیتوپلاسمی بوده، ولی تمامی ساختارهای سطح سلول را داراست. امروزه با توجه به شیوع بالای سرطان در دنیا و استفاده از شیمی‌درمانی به عنوان یک درمان رایج و آثار سوء آن، وجود یک حامل برای انتقال هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین در زمینه واکسیناسیون اهمیت یک حامل با خصوصیات ادجوانتی که بتواند آنتی‌ژن‌ها را انتقال دهد، ضروری است. اشباح باکتریایی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی که داراست، می‌تواند قابلیت انتقال دارو، انتقال ژن و آنتی‌ژن را داشته باشد. این مطالعه برای بررسی اشباح باکتریایی و کاربردهای آن در بیومدیسین انجام شد. در این مطالعه از مقاله‌های منتشر شده بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۵ و پایگاه‌های اطلاعاتی *pub med*، *google scholar*، *Science Direct* استفاده شد. جست‌وجو با استفاده از واژگان کلیدی نظیر *Bacterial ghost*، *vaccine*، *gene therapy* بر اساس *MeSH* انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از شیخ باکتریایی در بیومدیسین به نسبت مطلوب بود. به طوری که اشباح باکتریایی قادر به القا و تقویت سیستم ایمنی علیه پاتوژن‌های میکروبی شده و از سوی دیگر به افزایش جذب دارو، انتقال و همچنین انتشار آن در بافت هدف منجر می‌شود.

**واژگان کلیدی:** شیخ باکتریایی، واکسن، انتقال ژن

### مقدمه

باکتری زنده است (۲۰۱) این روند با ایجاد یک سوراخ کوچک در انولوپ باکتری آغاز و سپس با خروج محتوای سیتوپلاسمی باکتری به دلیل اختلاف فشار اسمزی سیتوپلاسم با محیط، ادامه می‌یابد. یکی از مهم‌ترین مزیت‌های اصلی شیخ باکتری غیر زنده بودن آن است، درحالی که تمامی اجزای آنتی‌ژنی و ساختاری باکتری اولیه با همان عملکردهای طبیعی حفظ شده است (۴،۳،۲)

شیخ باکتریایی (*Bacterial Ghost*) در سال‌های اخیر به دلیل داشتن کاربردهای نوید بخش پزشکی و دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. شیخ باکتریایی، پوشش‌های باکتریایی بدون محتوای داخلی باکتری است. این اشکال همه خصوصیات ساختاری، مورفولوژیکی و آنتی‌ژنی دیواره سلولی را دارا بوده و در حقیقت دارای ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری

نویسنده مسئول: دکتر مهدی گودرزی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی  
gudarzim@yahoo.com

بلکه فاکتورهای دیگری از قبیل: رشد فعال و عناصر کنترل کننده تقسیم سلولی و فعالیت اتولیتیک باکتری میزبان، مکان‌های چسبندگی غشاء، پروتئین FtsZ در سپتوزوم، ایزومرهای پرولین که برای تغییرات ساختاری پروتئین، مورد نیاز هستند، چاپرون‌ها، قدرت پتانسیل غشاء، فعالیت سیستم اتولیتیک، pH و قدرت اسمزی محیط و عوامل دیگر نیز روند لیز را تحت تاثیر قرار می‌دهند. (۲۶-۲۲)

بیان ژن E می‌تواند از طریق کنترل رونویسی پروموتور حساس به دما EpL/pR-cI857 یا سیستم‌های رپرسوری مانند lacPO یا سیستم بیانی tol انجام می‌شود. جهش در قسمت اپراتور از پروموتور EpR می‌تواند یک سیستم بیانی جدید ایجاد کند که بیان ژن E را در دمای بالای  $37^{\circ}\text{C}$  القا می‌کند. (۲۷،۱۶)

روش دیگر برای ایجاد شیخ باکتریایی، استفاده از مواد شیمیایی فعال مانند  $\text{CaCO}_3$ ،  $\text{NaOH}$ ،  $\text{SDS}$  و  $\text{H}_2\text{O}_2$  است. برای این منظور MIC (Minimum Inhibition Concentration) و MGC (Minimum Growth Concentration) مربوط به این مواد تعیین می‌شود. کم‌ترین غلظت از این مواد شیمیایی به کار رفته که مسئول کشتن باکتری هستند با MIC و کم‌ترین غلظتی که بقای سلول‌های باکتریایی را میسر می‌سازد با MGC تعیین می‌شود. این روش میکروسکوپ معمولی و الکترونی برای ارزیابی کیفیت شیخ باکتریایی و اسپکتروفتومتر برای ارزیابی مقدار پروتئین و DNA تولید شده به کار می‌رود. برای تعیین وجود باقیمانده DNA پس از هر بار تولید شیخ باکتریایی، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. سلول‌های زنده‌ای که پس از اجرای این پروتکل وجود داشتند با القای ژن لیزوزومی که روی پلاسمید pLysS حمل می‌شود منهدم می‌شدند (۲۸،۱). این پروتکل بر مبنای کمینه کردن آثار  $\text{NaOH}$ ،  $\text{CaCO}_3$ ،  $\text{SDS}$  و  $\text{H}_2\text{O}_2$  است که به عنوان جایگزینی برای ژن E در تهیه شیخ باکتریایی استفاده می‌شوند. به نظر می‌رسد این تکنیک می‌تواند سبب ایجاد موثر و کارآمد باکتری شیخ شود، اما نیاز به مطالعه‌های بیشتر و بررسی روی باکتری‌های بیشتری است.

### کاربردهای شیخ باکتریایی

شیخ باکتریایی می‌تواند از باکتری‌های مختلفی از جمله سویه‌های آزمایشگاهی *Pectobacterium cypripedii*، *E. coli* C، *E. coli* K12 و سویه‌های پاتوژن انتروتوکسوژنیک و هموراژیک *E. coli*، سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، سالمونلا انتریتیدیس، شیگلا فلکسنری، ویبریو کلرا سرووار O1 و O139، هلیکوباکتر پیلوری، نایسریا منتریتیدیس، سودوموناس پوتیدا، کلبسیلا پنومونیه، بوردتلا برونشی سپتیکا، اکتینوباسیلوس پلورپنومونیه، پاستورلا مولتوسیدا، منهمیا همولیتیکا و فرانسیسلا تولرانسیس تهیه شود. این تنوع در ایجاد شیخ باکتریایی تولید شده از باکتری‌های گرم منفی پاتوژن در مقابل باکتری‌های غیر پاتوژن بیانگر یکی از کاربردهای مهم شیخ باکتریایی به عنوان واکسن است. تحقیقات با سویه‌های *E. coli* C و K12 بیشتر در مهندسی ژنتیک برای ایجاد شیخ باکتریایی و از اهداف آفت‌کشی گیاهان استفاده می‌شود. (۲۹،۱۶)

از کاربردهای شیخ باکتریایی می‌توان به استفاده از آن‌ها در واکنش‌های بیوشیمیایی به عنوان ادجوانت و همچنین وسیله انتقال DNA در ساخت واکسن، انتقال ژن‌های سوماتیک، انتقال دارو برای درمان تومورها، تولید بیوراکتورهای ریز مولکولی، ساخت اشکال مصنوعی باکتریایی، به عنوان ماشین‌های مولکولی در نانوتکنولوژی و میکروتکنولوژی اشاره کرد. (۳۰،۳۱،۳۲) به نظر می‌رسد که کاربرد اشباح باکتریایی در سیستم‌های پیشرفته تحویل دارو منجر به گسترش تحقیقات برای چگونگی تولید و تغییر این اشباح و استفاده از پوشش‌های سلولی فاقد محتوای ژنتیکی برای کاربردهای زیست پزشکی شده است.

شایان ذکر است که اشباح باکتریایی می‌تواند جایگزین‌های مناسبی برای واکسن‌های تولید شده با استفاده از مواد شیمیایی، گرما یا اشعه برای غیر

تا کنون مطالعه‌های متعددی در باره اشباح باکتریایی و کاربردهای آن انجام گرفته است که نتایج این مطالعه‌ها حاکی از اثربخش بودن این تکنیک در زمینه پزشکی مانند واکنش‌های انتقال دارو است. در ایران در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور تهران، دکتر طالب خان وهمکارانش از شیخ باکتریایی برای واکسن هلیکوباکتر استفاده کردند. آن‌ها از پروتئین omp18 و همچنین سم ویبریوکلرا در شیخ باکتری هلیکوباکتر پیلوری استفاده کردند و نتیجه حاصله نشان از کاهش کلونیزاسیون هلیکوباکتر در معده موش داشت.

شیخ باکتریایی به عنوان یک تکنیک جدید برای انتقال دارو، ژن درمانی و تحریک سیستم ایمنی کاربرد دارد. همان طور که بسیاری از داروها برای درمان بیماری‌ها به دلیل افزایش غلظت داروی آزاد در بدن، سبب ایجاد عوارض جانبی می‌شوند و با علم به این مطلب که بسیاری از بافت‌های بدن نسبت به داروها نفوذ ناپذیرند، وجود یک وکتور مناسب با کارایی بالا برای انتقال دارو و همچنین وجود یک حامل مناسب برای عرضه آنتی‌ژن برای تولید واکسن موثر ضروری به نظر می‌رسد. به طور کلی با توجه به دانسته‌های اندک در زمینه اشباح باکتریایی و اهمیت استفاده از آن‌ها به عنوان یک روند موثر در پروسه درمان و نیز پیشگیری، با هدف بررسی نحوه تولید شیخ باکتریایی و بررسی کاربردهای آن در زمینه پزشکی انجام گرفت. به طوری که نبود اطلاعات کافی در نحوه استفاده از این اشباح به بروز تبعات جبران‌ناپذیر در امر پزشکی، درمان و پیشگیری منجر خواهد شد.

### روش کار

در این مطالعه که یک مطالعه مروری است، از مقالات موجود درباره کاربرد اشباح باکتریایی و همچنین نحوه تشکیل آن‌ها در فاصله بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۵ استفاده شده است. در این مطالعه ما ابتدا از پایگاه‌های اطلاعاتی google scholar، ScienceDirect pubmed، با واژگان کلیدی نظیر Bacterial ghost and vaccine، Bacterial ghost and Bacterial ghost and genetherapy، مقاله‌های موجود تهیه و طی بررسی این مقاله‌ها، از ۴۶ مقاله معتبر به عنوان منبع تحقیقاتی خود استفاده کردیم.

### روند ایجاد شیخ باکتریایی

روش معمولی که امروزه برای ایجاد شیخ باکتریایی به کار می‌رود، بیان ژن E در باکتری است. ژن E پلی‌پپتیدی با ۹۱ اسید آمینه را کد می‌کند و از باکتریوفاژ ΦX ۱۷۴ گرفته می‌شود که بعد از کلون کردن این ژن تحت شرایط کنترل شده در داخل یک وکتور، آن را به باکتری مورد نظر انتقال می‌دهد. (۶،۵) برخلاف دیگر پروتئین‌های لیتیک، این پروتئین هیچ فعالیت آنزیمی ذاتی ندارد. (۱۰،۹،۸،۷)

پروتئین کد شده توسط ژن E باعث ایجاد یک تونل در دیواره سلولی باکتری می‌شود و از طریق آن محتویات سیتوپلاسمی به بیرون تراوش می‌کند (۱۴-۱۱). به طور میانگین، قطر تونل بین غشایی ایجاد شده توسط این پروتئین از ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر متفاوت است. (۱۶،۱۵) اختلاف در اندازه و ساختارهای نامنظم تونل نشان می‌دهد که ساختار تونل بین غشایی، از لحاظ دینامیک به احتمال از خروج محتوای سیتوپلاسم و الگوی قرارگیری اولیگومرهای E ناشی می‌شود. (۱۷) باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به اثر پروتئین E حساس‌تر هستند، به طوری که قبل از تشکیل تونل، سلول باکتری‌های گرم مثبت متلاشی می‌شود، اما در باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود فضای پری پلاسمیک و غشای خارجی این روند به صورت تشکیل تونل نمایان می‌شود. (۱۸)

مطالعه‌های انجام شده توسط میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که ساختار تونل غشایی ایجاد شده توسط پروتئین E، به طور تصادفی در طول غشای سلولی توزیع نشده‌است، بلکه به بخش‌هایی از جایگاه‌های تقسیم بالقوه محدود می‌شود که اغلب در میانه سلول یا در جایگاه‌های قطبی هستند. (۲۱،۲۰،۱۹،۱۶)

با این حال القای ژن E، تنها شرط لازم برای لیز به واسطه این ژن نیست،

حالت ثابت جریان مایع اشک فقط مانع نفوذ عوامل آسیب زا نمی‌شوند، بلکه از نفوذ عوامل درمانی نیز جلوگیری می‌کنند. بنابراین برنامه‌های تحویل که بر این مانع غلبه می‌کنند، مصرف موثر دارو را برای مشکلات چشمی و بافت لنفونیدی میسر می‌سازند و به پیشبرد داروها، واکسن‌ها و ژن‌درمانی‌ها در مقابل بیماری‌های مختلف چشمی در آینده کمک خواهد کرد. به نظر می‌رسد شیخ باکتریایی تکنیک مناسب برای انتقال دارو به بافت‌هایی با نفوذپذیری کم باشد.

### انتقال ژن

از DNA یا داروها می‌توان به عنوان مواد فعال برای درمان تومور استفاده کرد. تحقیق‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های ملانوم انسانی و کارسینوم کلون را می‌توان با شیخ باکتریایی به ترتیب برای انتقال DNA یا داروها مورد هدف قرار داد. (۳۷،۳۶) در یک بررسی، هشت خط سلولی ملانوم که عملکردهای زیادی به صورت مشترک با سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن دارند، از لحاظ توانایی اتصال و فاگوسیتوز کردن شیخ باکتریایی بررسی شدند. سلول‌های Bowes حدود ۸۰ درصد ژن نشان‌دار شده‌ای که توسط شیخ باکتریایی به آن‌ها انتقال داده شده بود، را بیان کردند. این مطالعه نشان داد که سیستم شیخ باکتریایی به عنوان ابزاری برای انتقال RNAهای عملکردی مثل siRNA که آنزیم‌هایی برای تبدیل دارویی هستند، به کار می‌رود. (۳۸)

سلول‌های siRNA که از اجزای عملکردی مسیر RNA interference (RNAi) هستند، یکی از مهم‌ترین و موثرترین راه‌های خاموش‌سازی ژن‌ها در سلول‌های جانوری هستند. آن‌ها می‌توانند بیان ژن‌ها را در مرحله پس از رونویسی مهار کنند. در حقیقت siRNA در تنظیم بیان ژن نقش دارد. siRNA فعال‌کننده قوی سیستم ایمنی اولیه است که می‌تواند بیان سایتوکاین‌ها و اینترفرون‌ها را با مقدار زیاد القا کند. به نظر می‌رسد از طریق اشباح باکتریایی می‌توان siRNA را وارد سلول‌های سرطانی و بیان ژن‌های سرطانی را خاموش کرد. همچنین می‌توان از آن برای فعال شدن برخی آنزیم‌ها برای شکستن برخی داروها و فعال کردن عملکرد داروها استفاده کرد. با توجه به اهمیت این ژن‌ها و آنزیم‌ها برای تغییر عملکرد سلول‌های سرطانی و فعال کردن دارو‌ها، به نظر اشباح باکتریایی سیستم مناسبی برای انتقال هستند.

### ساخت واکسن

در مطالعه‌ای که از سوی Arby Abtin و همکاران انجام شد، آثار اشباح باکتریایی به دست آمده از E.coli در تحریک سیستم ایمنی و تولید سایتوکاین‌های پیش‌تهابی و پپتیدهای آنتی‌میکروبیال ارزیابی شد به طوری که اشباح باکتریایی مشتق شده از تیپ وحشی E.coli نسبت به اشباح باکتریایی به دست آمده از E.coli با نقص در فلاژلین، بیشتر می‌توانست باعث ایجاد پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی و سایتوکاین‌های پیش‌تهابی شود. در این مطالعه نشان داده شد که اشباح باکتریایی دارای فلاژلین توانایی القای بیان واسطه‌های ایمنی ذاتی را، بیشتر از اشباح باکتریایی فاقد فلاژلین دارد (۳۹). به نظر می‌رسد استفاده از سویه‌های وحشی فاقد نقص زنتیکی در ایجاد شیخ باکتریایی، می‌تواند با تولید سایتوکاین‌ها سیستم ایمنی را بهتر تقویت کند.

در مطالعه‌ای که از سوی طالب خان و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران انجام گرفت، از شیخ هلیکوباکتر پیلوری حاوی Omp18 نوترکیب به عنوان یک واکسن کارآمد در ایمونیزاسیون موش‌های آلوده به هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد. این واکسن در نهایت باعث افزایش قابل توجه آنتی‌بادی اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری شده و کلونیزاسیون این باکتری را در معده کاهش می‌داد. Omp18 باعث القای تولید IL-10، IL-۱۲ و IFN- $\gamma$  می‌شد که موش C57BL/6 را در برابر عفونت هلیکوباکتر پیلوری محافظت می‌کرد. (۴۰) واکسیناسیون‌های خوراکی، آنتی‌ژن‌های بسیار محافظت شده و ایمنی را به مخاط معده منتقل می‌کنند که به خاطر قدرت‌شان در ایجاد ایمنی مخاطی، به عنوان بهترین روش‌ها

فعال‌سازی پاتوژن‌ها باشند. همه این روش‌ها اجزای ساختاری ضروری باکتری‌ها را تغییر شکل می‌دهند در حالی که فرآیند لیز به وسیله ژن E برای تولید اشباح باکتریایی، روش ژنتیکی، بیوشیمیایی است که به حفظ بیشتر خصوصیات آنتی‌ژنی آن‌ها منجر می‌شود.

### انتقال دارو:

همان‌طور که پیشتر اشاره شد اشباح باکتریایی می‌توانند به عنوان یک عامل موثر در انتقال دارو ایفای نقش کنند. در بررسی که از سوی Verena Juliana و همکاران انجام شد، از شیخ باکتریایی برای انتقال داروی رسوراترول (Resveratrol) استفاده شد. آن‌ها نشان دادند که این دارو مانع تولید نیتریک اکسید (NO) در ماکروفاژ شده در حالی که هیچ‌گونه تاثیر سایتوتوکسیکی روی آن‌ها نداشت. (۳۳) رسوراترول عامل پایین آورنده کلسترول بد خون است و خطر ابتلا به امراض قلبی را کاهش و همچنین به عملکرد بهتر سلول‌های دفاعی کمک می‌کند. به نظر می‌رسد باکتری‌های شیخ و کتور مناسبی برای انتقال این دارو به ماکروفاژها و جلوگیری از افزایش کلسترول خون و تبعات ناشی از آن باشد.

در مطالعه دیگر نشان داده شد که شیخ باکتریایی هیچ‌گونه تاثیر توکسیکی روی رده‌های سلولی انسانی ندارد و می‌تواند آثار منفی ماده نگهدارنده بنزالکونیوم کلراید (BAC) را از بین ببرد و با فعالیت پر اکسیدازی خود H2O2 تولید شده توسط BAC را خنثی می‌کند. از شیخ باکتریایی مختلفی در این بررسی استفاده شد و بهترین نتایج با ETECH ۱۰۴۰۷ به دست آمد (۳۴). به نظر می‌رسد عدم تاثیرکشنده روی سلول‌ها و قدرت جذب سلولی شیخ باکتریایی می‌تواند برای اهداف درمانی مناسب باشد.

در مطالعه Paukner و همکارانش در سال ۲۰۰۴، طی تحقیقاتی از شیخ باکتریایی بارگذاری شده با دوگزوروبیسین (DOX) در درمان خط سلولی سرطان روده بزرگ در انسان استفاده و آن را با داروهای آزاد مقایسه کردند. در ادامه تحقیق‌ها مشخص شد که شیخ باکتریایی حاوی DOX غلظت‌های بازدارنده رشد را تا بیش از ۳۰۰ بار در مقایسه با EC50 داروی آزاد کاهش می‌دهد و غلظت‌های DOX داخل سلولی را تا ۴۲ بار در مقایسه با داروی آزاد افزایش می‌دهد. DOX دارای عوارض جانبی بر عملکرد قلب است و اغلب باید به محض رسیدن دارو به حداکثر دوز بحرانی، درمان تومور خاتمه یابد. بنابراین کاهش دوز مصرفی به عنوان یکی از مزیت‌های شیخ باکتریایی محسوب می‌شود (۳۵). این دارو سبب حساس شدن بافت‌های سرطانی نسبت به مواد پرتوزا برای تشخیص سلول‌های سرطانی می‌شود. به نظر می‌رسد با استفاده از شیخ باکتریایی و افزایش ضریب جذب مواد حساس‌کننده پرتویی، می‌توان در تشخیص سلول‌های سالم از سلول‌های سرطانی بهره جست.

در مطالعه Pavol Kudela و همکارانش، کارایی سلول‌های ملتحمه را در جذب شیخ باکتریایی با استفاده از خط سلول اپیتلیومی Chang و سلول‌های اپیتلیومی مشتق شده از ملتحمه انسان بررسی کردند. در این مطالعه مشاهده شد که شیخ باکتریایی ظرفیت بالایی برای ورود به رده سلولی ملتحمه انسان داراست و هیچ‌گونه اثرسیتوتوکسیکی روی این رده ندارد. علاوه بر این، انکوباسیون ترکیبی با اشباح باکتریایی، ظهور MHC کلاس I و II را افزایش نداد، اما باعث افزایش ظهور ICAM-1 شد. در نتیجه این مطالعه شیخ باکتریایی را به عنوان یک حامل مناسب برای انتقال دارو در بیماری‌های چشمی معرفی می‌کند. (۳) شایان ذکر است که با توجه به بررسی‌های انجام شده ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که اپیتلیوم سطح چشم، نقش اساسی در حفاظت از چشم در مقابل فاکتورهای محیطی و پاتوژن‌ها ایفا می‌کند. این اپیتلیوم که ابتدا به عنوان یک مانع فیزیکی عمل می‌کند از چشم در برابر آسیب و پاتوژن‌ها و مواد حساسیت‌زا دفاع و به عنوان بخشی از بافت لنفونید همراه با چشم (EALT) به هموستاز سطح چشم کمک می‌کند. عملکرد ممانعتی اپیتلیوم ملتحمه چالشی را برای تحویل داروها و آنتی‌ژن‌ها برمی‌انگیزد. اتصالات محکم داخل سلولی و

کلامیدیاست، را در ویبریوکلا بیان کردند و سپس با پروتئین E ایجاد BG کردند. در این مطالعه واکنش‌های چند زیر واحدی را با تک زیر واحدی مقایسه کردند. واکنش چند زیر واحدی در مقایسه با واکنش تک زیر واحدی از ایمنی‌زایی بهتری برخوردار بود که فراوانی بیشتر سلول‌های Th1 و قابلیت نسبتاً بیشتری برای ایجاد ایمنی حفاظتی فراهم می‌کرد. (۴۶) موثرترین اقدام بلندمدت برای کنترل بیماری عفونی oculogenital در انسان استفاده از واکنس‌های کارآمد است که از باکتری *Chlamidia trachomatis* ناشی می‌شود. تعیین توالی ژنوم کلامیدیا چندین گزینه بالقوه را به عنوان واکنس مشخص کرده‌است و مشکل فعلی ایجاد وسیله‌ای کارآمد برای انتقال است که سطوح بالایی از پاسخ‌های سلول B مکمل و سلول T مخاطی را ایجاد کند. باکتری‌های شیخ ویبریوکلا سمی نیستند و وسیله‌ای کارآمد برای ارسال محسوب می‌شوند و از ویژگی تحریک ایمنی قدرتمندی برخوردارند و در بافت‌های مخاطی پاسخ‌های Ab و سلول T را القا می‌کنند. این فرضیه را بررسی کردیم که rVCG می‌تواند به عنوان وسیله کارآمدی برای ارسال واکنس‌های کلامیدیایی یک یا چند زیر واحدی عمل کند تا به این ترتیب ایمنی حفاظتی بالایی ایجاد کند. عفونت تناسلی با باکتری درون سلولی اجباری به نام کلامیدیا تراکوماتیس بخصوص در زنان خطر مهمی را مطرح می‌کند و اغلب به بیماری التهابی لگن، بارداری خارج رحمی و ناباروری منجر می‌شود. ساخت و استفاده از واکنس پیشگیری کننده یا واکنس درمانی که می‌تواند علیه عفونت یا حتی بهبود بیماری‌های سخت از بدن محافظت کند، همچنان موثرترین و نویدبخش‌ترین استراتژی برای کنترل بیماری‌های کلامیدیایی محسوب می‌شود که به دلیل بیماری‌زایی بالای آن در سراسر جهان مسئله‌ای اساسی در حوزه بهداشت عمومی محسوب می‌شود. پیشرفتی که در دو دهه اخیر در زمینه بیوتکنولوژی و ایمنی‌شناسی مولکولی حاصل شده‌است به جابه جایی تدریجی از سمت واکنس‌های کلاسیک و حاوی سلول کامل به سمت واکنس‌هایی منجر شده‌است که حاوی عوامل بیماری‌زای سالم و زنده ولی تضعیف شده تاپتیدها یا واکنس‌هایی زیر واحدی هستند. بنابراین ایجاد واکنس‌هایی بر اساس اجزای زیر واحدی کلامیدیایی کانون فعلی طراحی واکنس کلامیدیایی محسوب می‌شود. پروتئین غشای خارجی اصلی (MOMP) یکی از گزینه‌های برتر برای واکنس زیر واحدی است. این پروتئین ۴۰ kDa که قدرت ایمنی‌زایی بالایی دارد، به عنوان یک پورین، عامل چسبندگی، شاخص اصلی برای حالت اختصاصی جنس و گونه کلامیدیا و به عنوان واکنس بسیار نویدبخش به خوبی توصیف شده‌است. سایر کاندیدهای بالقوه برای ساخت واکنس در کمپلکس غشای خارجی کلامیدیا تراکوماتیس عبارتند از پروتئین‌های غشای خارجی که از سیستمین غنی هستند. مانند OMP2 (60 kDa) و OMP3 (15 kDa). هر چند OMP2 در بین گونه‌های مختلف پنج ناحیه را نشان می‌دهد، در هر گونه از کلامیدیا به خوبی حفظ شده‌است و به عنوان آنتی‌ژنی با قابلیت ایجاد واکنش ایمنی بالا شناخته می‌شود که واکنش‌های آنتی‌بادی را در انسان و حیوان القا می‌کند و نیز عامل ایمنی‌زایی اساسی در عفونت‌های کلامیدیایی محسوب می‌شود.

### نتیجه گیری و بحث

شیخ باکتریایی (BGs) تمام ویژگی‌های مورفولوژیک، ساختاری، آنتی‌ژنی دیواره سلولی را دارا است و به عنوان کاندید مناسبی برای تحریک سیستم ایمنی و واکنس‌ناسیون، همچنین حامل‌های دارویی مطرح است. سرطان در جهان افزایش چشمگیری دارد به طوری که سازمان بین المللی تحقیقات روی سرطان (IARC) میزان مرگ و میر ناشی از سرطان را از ۸٫۲ میلیون نفر به ۱۳ میلیون نفر در سال اعلام کرد چرا که جمعیت جهان افزایش می‌یابد. شیوع بالای سرطان منجر به افزایش استفاده از تکنیک‌های شیمی‌درمانی و پرتو درمانی شده است. این تکنیک‌ها سبب آسیب به بافت‌های سالم نیز می‌شود. در نتیجه وجود تکنیک‌های جدید که بتواند به صورت هدفمند دارو را به بافت سرطانی منتقل کند

در واکنس‌ناسیون Hp شناخته می‌شوند. جدیدترین واکنس مورد استفاده در انسان شامل *CagA*، *NapA* و *VacA* می‌شود که پاسخ‌های سلول T خاصی را نمایان می‌کند. با وجود این موضوع، لیزات تمام سلولی که تمامی اجزای ایمنی Hp را شامل می‌شود به عنوان موثرترین واکنس شناخته می‌شود. Omp18 به عنوان یک پپتیدوگلیکان در معرض سطح، می‌تواند تولید IL-10 یک ترویج دهنده Th2 و IL-12 یک پیش‌نیاز Th1 را از سلول‌های دندریتیک مغز استخوان به همراه ترشح IFN- $\gamma$  توسط لمفوسیت های Th1 ایجاد کند که همگی برای فعال‌سازی موثر هومورال میزبان و ایمنی سلولی ضروری هستند. این دستاورد احتمالات جدید و مهیجی را مهیا می‌کند که باید دوباره و با تعداد موش‌های بیشتری تایید شود که دارای پیش‌زمینه های ژنتیکی متفاوتی هستند.

در مطالعه ای که از سوی Thomas Ebsen و همکاران انجام گرفت، از شیخ باکتری منهبیا همولیتیکا به عنوان یک سیستم انتقال در ساخت واکنس استفاده شد. این شیخ باکتریایی باعث تعدیل پاسخ‌های Th1 و Th2 می‌شد. همچنین نشان داده شد که سلول‌های دندریتیک دارای یک نقش کلیدی در تحریک پاسخ‌های سیستم ایمنی، در زمان استفاده از شیخ باکتریایی به عنوان یک سیستم انتقال DNA هستند. به نظرمی‌رسد شیخ باکتریایی به عنوان یک ادجوانت باعث تقویت بلوغ و فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک می‌شوند. در این بررسی توانایی شیخ باکتریایی در تحریک تولید سایتوکاین توسط این سلول‌ها ارزیابی شد. به طوری که تولید IL-1 $\alpha$  و IL-6 به ترتیب ۲٫۴ و ۶۱۵ بار بیشتر از سلول‌های دندریتیک تحریک نشده بود. (۲)

و همکارانش در سال ۲۰۰۳، روی شیخ باکتریایی و ویبریوکلا در خرگوش مطالعه‌هایی را انجام دادند. در این مطالعه‌ها مشاهده شد که ایمنی‌سازی خرگوش با شیخ باکتریایی به صورت خوراکی باعث افزایش پاسخ ایمنی علیه سرووار O1 و سرووار O139 می‌شود. (۱۶، ۴۱) به نظر می‌رسد با استفاده از شیخ باکتریایی بتوان سیستم ایمنی را علیه عامل وبا تقویت و باعث ایمنی در انسان شد.

در مطالعه Hensel و همکارانش که روی آئروسول‌های اشباح باکتریایی اکتینوباسیلوس پلورپنومونیه در خوک انجام دادند قطر این آئروسول‌ها ۱-۳ میکرومتر بود. در این مطالعه مشاهده شد خوک‌هایی که با این آئروسول‌ها مورد هدف قرار گرفته‌اند، دارای سطح بالایی از ایمنی هستند و شدت زخم‌های ناشی از این باکتری در آن‌ها به طور چشمگیری کاهش یافت. پاتوژن اکتینوباسیلوس و مدل آزمایشگاهی خوک که در این بررسی استفاده شده بود، مدل خوبی برای ایمن‌سازی ریه انسان یا تحویل داروهای آئروسولی به عمق فضای آلوئولی به شمار می‌روند (۱۶، ۴۳، ۴۲). در این مطالعه به خوبی نشان داده شد که استفاده از شیخ باکتریایی سطح ایمنی را در خوک افزایش داد.

در مطالعه‌ای که از سوی Mayer و همکارانش روی EHEC BG در موش انجام شد، نتایج به دست آمده نشان داد که موش‌ها پس از دو دوز مصرف خوراکی BG ایمن شدند، در حالی که در بررسی‌های بیشتر مشاهده شد که همین نتیجه را می‌توان با یک ایمن‌سازی مقعدی در موش با EHEC BG به دست آورد. (۴۴)

در یکی از مطالعه‌های اخیر، آنتی‌ژن ۱۴۹ هسته ویروس هیپاتیت B به عنوان پروتئین فیوژن در OMP-A قرار داده شد و بر سطح اشباح باکتریایی، *E. coli* بیان شد. این شیخ منجر به القای پاسخ ایمنی معناداری در برابر آنتی‌ژن ۱۴۹ هسته HBC در موش‌ها شد. (۱۶، ۴۵) به نظر می‌رسد با این تکنیک بتوان آنتی‌ژن‌های ویروسی را روی شیخ باکتریایی لود کرد و سلول‌های سیستم ایمنی را علیه عوامل ویروسی تقویت کرد.

Francis و همکارانش برای درمان عفونت‌های کلامیدیا تراکوماتیس از باکتری‌های شیخ ویبریوکلا استفاده کردند. این شیخ باکتریایی اثر سمی ندارد و وسیله‌ای کارآمد برای انتقال محسوب می‌شوند و از ویژگی تحریک ایمنی قدرتمندی برخوردارند. پروتئین Omp که از پروتئین‌های غشایی

می‌تواند منجر به آسیب‌های بافتی شود. لازم است با دستکاری ژنتیکی، بخشی از این آنتی‌ژن‌ها را قبل از عرضه به بدن، غیر فعال کرد. از محدودیت‌های دیگر BGs، دشوار بودن تولید آن در باکتری‌های گرم مثبت است که باید مطالعه‌های بیشتری برای یافتن روش‌های مناسب‌تر برای ایجاد BGs در گرم مثبت انجام گیرد.

با این حال آسان بودن روش تولید BGs، هزینه کم و ایجاد ایمنی پایدار می‌تواند این تکنیک را به عنوان روش مناسبی برای اهداف درمانی معرفی کند. تحقیقات نشان داده که استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی در مقایسه با روش‌های شیمیایی در تولید واکسن، باعث افزایش تحریک سیستم ایمنی می‌شود.

باتوجه به کاربردهای فراوان این تکنیک و نتایج به دست آمده، ضرورت مطالعه بیشتر روی این تکنیک و کارایی آن ضروری است.

#### پیشنهادات:

باتوجه به کاربردها و ویژگی‌های شبح باکتریایی می‌توان در زمینه تصویربرداری مولکولی به عنوان یک ایده جدید استفاده کرد. همچنین می‌توان از آن برای افزایش جذب حساس‌کننده‌های پرتویی لود شده در شبح باکتریایی استفاده کرد که باعث افزایش ضریب جذب حساس‌کننده پرتویی در بافت تومورال هدف شود.

لود مواد پرتوزا درون شبح باکتریایی که باعث افزایش ضریب جذب مواد پرتوزا درون بافت هدف می‌شود، می‌تواند باعث افزایش کیفیت تصویربرداری و همچنین حفاظت پرتویی ارگان‌های سالم می‌شود.

## منابع

- Amara AA, Salem-Bekhit MM, Alanazi FK. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts. *Sci World J*. 2013;1-7.
- Ebensen T, Paukner S, Link C, Kudela P, de Domenico C, Lubitz W, Guzmán CA. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines. *J Immunol*. 2004;172(11):6858-65.
- Kudela P, Koller VJ, Mayr UB, Nepp J, Lubitz W, Barisani-Asenbauer T. Bacterial Ghosts as antigen and drug delivery system for ocular surface diseases: Effective internalization of Bacterial Ghosts by human conjunctival epithelial cells. *J Biotech*. 2011;153(3):167-75.
- Witte A, Wanner G, Sulzner M, Lubitz W. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 1992;157(4):381-8.
- Weisbeek PJ, Borrias WE, Langeveld SA, Baas PD, Van Arkel GA. Bacteriophage phiX174: gene A overlaps gene B. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 4(6):2504-8.
- Pollock TJ, Tessman E, Tessman I. Identification of lysis protein E of bacteriophage phiX174. *J Virol*. 1978;28(1):408-10.
- Witte A, Bläsi U, Halfmann G, Szostak M, Wanner G, Lubitz W. PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Biochimie*. 1990;72(2-3):191-200.
- Markert A, Zillig W. Studies on the lysis of *Escherichia coli* C by bacteriophage phiX174. *Virology*. 1965;25(1):88-97.
- Lubitz W, Harkness RE, Ishiguro EE. Requirement for a functional host cell autolytic enzyme system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage phi X174. *J Bacteriol*. 1984;159(1):385-7.
- Bläsi U, Linke RP, Lubitz W. Evidence for membrane-bound oligomerization of bacteriophage phi X174 lysis protein-E. *J Biol Chem*. 1989;264(8):4552-8.
- Schön P, Schrot G, Wanner G, Lubitz W, Witte A. Two-stage model for

ضروری است. اشباح باکتریایی با قابلیت جذب سلولی قوی و ظرفیت بالایی که در انتقال آنتی ژن و دارو دارا هستند، به نظر می‌رسد بتوانند جایگزین مناسب برای درمان باشند. همان طوری که Paukner و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در تحقیقاتی از BG بارگذاری شده با دوگورویسین (DOX) در درمان خط سلولی سرطان روده بزرگ در انسان استفاده کردند. نتایج نشان داد که جذب درون سلولی دارو افزایش یافته و در نتیجه داروی آزاد کمتری در بدن می‌تواند جریان یابد و آسیب کمتری بر سلول‌های سالم ایجاد کند. (۳۵) اشباح باکتریایی خاصیت ادهزینی بالایی دارند. با توجه به این ویژگی استفاده از اشباح باکتریایی برای درمان بافت‌ها با قابلیت نفوذپذیری کم می‌تواند یک راهکار جدید باشد. استفاده از شبح باکتریایی برای انتقال دارو به این بافت‌ها به نظر موثر باشد. همانطوری که Pavol و Kudela و همکارانش کارایی سلول‌های ملتحمه را در جذب BGs با استفاده از خط سلول اپیتلیومی Chang و سلول‌های اپیتلیومی مشتق شده از ملتحمه انسان بررسی کردند. نتایج نشان داد که اشباح باکتریایی بدون خاصیت سیتوتوکسینی و با ظرفیت بالایی می‌تواند جذب سلول‌های ملتحمه شود. (۳) حامل‌های باکتریایی در مقایسه با حامل‌های ویروسی، دارای فضای بیشتری برای لود یا بارگیری آنتی‌ژن، دارو و پلاسمید است.

با این وجود باید توجه داشت که وجود مقدار زیادی از لیپوپلی ساکارید، می‌تواند در بدن ایجاد تب و شوک کند. بنابراین دوز استفاده از BGs باید کنترل شود. هر چند در مطالعه‌های انجام گرفته، تا کنون عوارض جانبی گزارش نشده است. (۱۸) وجود آنتی ژن‌های فراوانی که در باکتری شبح موجود است، می‌تواند سیستم ایمنی را بیش از حد تحریک و در نتیجه

integration of the lysis protein E of  $\Phi$ X174 into the cell envelope of *Escherichia coli*. *FEMS microbiol Rev*. 1995;17(1-2):207-12.

- Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubitz W. The bacterial ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs*. 2010;1(5):326-36.
- Pantheil K, Jechlinger W, Matis A, Rohde M, Szostak M, Lubitz W, et al. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. *Infect Immun*. 2003;71(1):109-16.
- Szostak MP, Hensel A, Eko FO, Klein R, Auer T, Mader H, Haslberger A, Bunka S, Wanner G, Lubitz W. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *J Biotech*. 1996;44(1):161-70.
- Witte A, Brand E, Mayrhofer P, Narendja F, Lubitz W. Dependence of PhiX174 protein E-mediated lysis on cell division activities of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 1998;170:259-68.
- Mayr UB, Walcher P, Azimpour C, Riedmann E, Haller C, Lubitz W. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv Drug Delivery Rev*. 2005;57(9):1381-91.
- Altman E, Young K, Garrett J, Altman R, Young R. Subcellular localization of lethal lysis proteins of bacteriophages lambda and phiX174. *J Virol*. 1985;53(3):1008-11.
- Halfmann G, Götz F, Lubitz W. Expression of bacteriophage PhiX174 lysis gene E in *Staphylococcus carnosus* TM300. *FEMS Microbiol Lett*. 1993;108(2):139-43.
- Witte AN, Wanner GE, Bläsi U, Halfmann GA, Szostak M, Lubitz W. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phi X174 lysis protein E. *J Bacteriol*. 1990;172(7):4109-14.
- Eko FO, Witte A, Huter V, Kuen B, Fürst-Ladani S, Haslberger A, Katinger

- A, Hensel A, Szostak MP, Resch S, Mader H. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system. *Vaccine*. 1999;17(13):1643-9.
21. Yu SY, Peng W, Si W, Yin L, Liu SG, Liu HF, Zhao HL, Wang CL, Chang YH, Lin YZ. Enhancement of bacteriolysis of Shuffled phage PhiX174 gene E. *Virology*. 2011;8(1):1.
22. Ebensen T, Paukner S, Link C, Kudela P, de Domenico C, Lubitz W, Guzmán CA. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines. *J Immunol*. 2004;172(11):6858-65.
23. Lubitz W, Halfmann G, Plapp R. Lysis of *Escherichia coli* after infection with  $\phi$ X174 depends on the regulation of the cellular autolytic system. *Microbiology*. 1984;130(5):1079-87.
24. Halfmann G, Leduc M, Lubitz W. Different sensitivity of autolytic deficient *Escherichia coli* mutants to the mode of induction. *FEMS Microbiol Lett*. 1984;24(2-3):205-8.
25. Zheng Y, Struck DK, Young R. Purification and functional characterization of  $\phi$ X174 lysis protein E. *Biochemistry*. 2009;48(22):4999-5006.
26. Witte A, Brand E, Mayrhofer P, Narendja F, Lubitz W. Mutations in cell division proteins FtsZ and FtsA inhibit  $\phi$ X174 protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 1998;170(4):259-68.
27. Jechlinger W, Szostak MP, Witte A, Lubitz W. Altered temperature induction sensitivity of the lambda pR/cI857 system for controlled gene E expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;173(2):347-52.
28. Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 1946;33(4):305-25.
29. Hatfaludi T, Liska M, Zellinger D, Ousman JP, Szostak M, Árpád Ambrus, Jalava K, Lubitz W. Bacterial ghost technology for pesticide delivery. *J Agric Food Chem*. 2004;52(18):5627-34.
30. Mayr UB, Walcher P, Azimpour C, Riedmann E, Haller C, Lubitz W. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv Drug Delivery Rev*. 2005;57(9):1381-91.
31. Jechlinger W, Haidinger W, Paukner S, Mayrhofer P, Riedmann E, Marchart J, Mayr U, Haller C, Kohl G, Walcher P, Kudela P. Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for antigen delivery. *Vaccine Delivery Strategies*. 2002:163-84.
32. Walcher P, Mayr UB, Azimpour-Tabrizi C, Eko FO, Jechlinger W, Mayrhofer P, Alefantis T, Mujer CV, DelVecchio VG, Lubitz W. Antigen discovery and delivery of subunit vaccines by nonliving bacterial ghost vectors. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(6):681-91.
33. Koller VJ, Dirsch VM, Beres H, Donath O, Reznicek G, Lubitz W, Kudela P. Modulation of bacterial ghosts-induced nitric oxide production in macrophages by bacterial ghost-delivered resveratrol. *FEBS J*. 2013;280(5):1214-25.
34. Khoshnoud S, Bahramian A, Goudarzi M. bacterial ghosts: new challenges in medical and pharmaceutical applications. *Int J Anal Pharm Biomed Sci*. 2015;4(6):43-7.
35. Paukner S, Kohl G, Lubitz W. Bacterial ghosts as novel advanced drug delivery systems: antiproliferative activity of loaded doxorubicin in human Caco-2 cells. *J Controlled Release*. 2004;94(1):63-74.
36. Brady MS, Lee F, Petrie H, Eckels DD, Lee JS. CD4+ T cells kill HLA-class-II-antigen-positive melanoma cells presenting peptide in vitro. *Cancer Immun Immunother*. 2000;48(11):621-6.
37. Curiel-Lewandrowski C, Demierre MF. Advances in specific immunotherapy of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(2):167-88.
38. Kudela P, Paukner S, Mayr UB, Cholujova D, Kohl G, Schwarczova Z, Bizik J, Sedlak J, Lubitz W. Effective gene transfer to melanoma cells using bacterial ghosts. *Cancer Lett*. 2008;262(1):54-63.
39. Abtin A, Eckhart L, Mildner M, Gruber F, Schröder JM, Tschachler E. Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *FASEB J*. 2008;22(7):2168-76.
40. Talebkhan Y, Bababeik M, Esmaili M, Oghalaei A, Saberi S, Karimi Z, Afkhami N, Mohammadi M. *Helicobacter pylori* bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine. *J Microbiol Methods*. 2010;82(3):334-7.
41. Eko FO, Schukovskaya T, Lotzmanova EY, Firstova VV, Emalyanova NV, Klueva SN, Kravtsov AL, Livanova LF, Kutyrav VV, Igietseme JU, Lubitz W. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine*. 2003;21(25):3663-74.
42. Katinger A, Lubitz W, Szostak MP, Stadler M, Klein R, Indra A, Huter V, Hensel A. Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated *Actinobacillus pleuropneumoniae* are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses. *J Biotech*. 1999;73(2):251-60.
43. Hensel A, van Leengoed LA, Szostak M, Windt H, Weissenböck H, Stockhofe-Zurwieden N, Katinger A, Stadler M, Ganter M, Bunka S, Pabst R. Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *J Biotech*. 1996;44(1):171-81.
44. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, Lubitz W, Ignatyev G. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157: H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. *Infect Immun*. 2005;73(8):4810-7.
45. Jechlinger W, Haller C, Resch S, Hofmann A, Szostak MP, Lubitz W. Comparative immunogenicity of the hepatitis B virus core 149 antigen displayed on the inner and outer membrane of bacterial ghosts. *Vaccine*. 2005;23(27):3609-17.
46. Eko FO, Barisani-Asenbauer T. Development of a *Chlamydia trachomatis* bacterial ghost vaccine to fight human blindness. *Hum Vaccines*. 2008;4(3):176-83.