Research on Medicine Review Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.39; No.1; 2015

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

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*

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله مروری
دور۳۹، شماره ۱، ۱۳۹٤، صفحات ٤٨ تا ٥٤

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

شبح باکتریایی و کاربردهای آن‌ها در بیومدیسین

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

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: شبح 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 منحصربه 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 *google scholar*، *pub med* ، *Science Direct* استفاده شد. جست‌وجو با استفاده از واژگان کلیدی نظیر *Bacterial ghost*، *vaccine* و *gene therapy* بر اساس *MeSH* انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از شبح 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: شبح باکتریایی، واکسن، انتقال ژن

مقدمه

شبح باکتریایی (Bacterial Ghost) درسال‌های اخیر به دلیل داشتن کاربردهای نوید بخش پزشکی و دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. شبح 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 باکتری زنده است.(۲،۱) 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 شبح 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)

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

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

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 واکسیناسیون و انتقال دارو است. در ایران در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور تهران، دکتر طالب خان وهمکارانش از شبح باکتریایی برای واکسن هلیکوباکتر استفاده کردند. آن‌ها از پروتئین omp۱۸ و همچنین سم ویبریوکلرا در شبح باکتری هلیکوباکتر پیلوری استفاده کردند و نتیجه حاصله نشان از کاهش کلونیزاسیون هلیکوباکتر در معده موش داشت.

شبح باکتریایی به عنوان یک تکنیک جدید برای انتقال دارو، ژن‌درمانی 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 شبح 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 باکتریای و همچنین نحوه تشکیل آن‌ها در فاصله بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۵ استفاده شده است. در این مطالعه ما ابتدا از پایگاه‌های اطلاعاتی ScienceDirect pubmed، google scholar، با واژگان کلیدی نظیر Bacterial ghost and vaccine،Bacterial ghost and genetherapy، Bacterial ghost، مقاله‌های موجود تهیه و طی بررسی این مقاله‌ها ،از ۴۶ مقاله معتبر به عنوان منبع تحقیقاتی خود استفاده کردیم.

روند ایجاد شبح باکتریایی

روش معمولی که امروزه برای ایجاد شبح باکتریایی به کار می‌رود، بیان ژن E در باکتری است. ژن E پلی پپتیدی 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، 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 ۳۷°C القا می‌کند.(۲۷،۱۶)

روش دیگر برای ایجاد شبح باکتریایی، استفاده از مواد شیمیایی فعال مانند CaCO3، NaOH، SDS و H2O2 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 شبح باکتریایی و اسپکتروفتومتر برای ارزیابی مقدار پروتیین و DNA تولید شده به کارمی رود. برای‌تعیین وجود باقیمانده DNA پس ازهر بار تولید شبح 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 منهدم‌می‌شدند (۲۸،۱). این پروتکل بر مبنای کمینه کردن آثار CaCO3، NaOH، SDS، و H2O2 است که به عنوان جایگزینی برای ژن E در تهیه شبح باکتریایی استفاده می‌شوند .به نظرمی‌رسد این تکنیک می‌تواند سبب ایجاد موثر و کارآمد باکتری شبح شود، اما نیاز به مطالعه‌های بیشتر و بررسی روی باکتری‌های بیشتری است.

کاربردهای شبح باکتریایی

شبح 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 مننژیتیدیس، سودوموناس پوتیدا، کلبسیلا پنومونیه، بوردتلا برونشی سپتیکا، اکتینوباسیلوس پلوروپنمونیه، پاستورلا مولتوسیدا، منهمیا همولیتیکا و فرانسیسلا تولرانسیس تهیه شود. این تنوع در ایجاد شبح باکتریایی تولید شده از باکتری‌های گرم منفی پاتوژن در مقابل باکتری‌های غیر پاتوژن بیانگر یکی از کاربردهای مهم شبح باکتریایی به عنوان واکسن است. تحقیقات با سویه‌های E. coli C و K12 بیشتر در مهندسی ژنتیک برای ایجاد شبح باکتریایی و از P.CYPRIPEDII برای اهداف آفت‌کشی گیاهان استفاده می‌شود.(۲۹،۱۶)

از کاربردهای شبح باکتریایی می‌توان به استفاده از آن‌ها در واکسیناسیون 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.(۳۲،۳۱،۳۰) 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

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

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 آنتی ژنی 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 شبح 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 هیچ گونه 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 شبح وکتور 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 شبح باکتریایی هیچ گونه تاثیر توکسیکی روی رده‌های سلولی انسانی ندارد و می‌تواند آثار منفی ماده نگهدارنده بنزآلکونیوم کلراید (BAC) را از بین ببرد و با فعالیت پر اکسیدازی خود H2O2 تولید شده توسط BAC را خنثی می‌کند. از شبح 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 شبح باکتریایی می‌تواند برای اهداف درمانی مناسب باشد.

در مطالعه Paukner و همکارانش در سال ۲۰۰۴، طی تحقیقاتی از شبح باکتریایی بارگذاری شده با دوگزوروبیسین (DOX) دردرمان خط سلولی سرطان روده بزرگ درانسان استفاده وآن را با داروهای آزاد مقایسه کردند. در ادامه تحقیق‌ها مشخص شد که شبح باکتریایی حاوی DOX غلظت‌های بازدارنده رشد را تا بیش از ۳۰۰ بار در مقایسه با EC۵۰ 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 شبح 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 شبح باکتریایی و افزایش ضریب جذب موادحساس کننده پرتویی، می‌توان در تشخیص سلول‌های سالم از سلول‌های سرطانی بهره جست.

در مطالعه Pavol Kudela و همکارانش، کارآیی سلول‌های ملتحمه را در جذب شبح باکتریایی با استفاده از خط سلول اپیتلیومی Chang و سلول‌های اپیتلیومی مشتق شده از ملتحمه انسان بررسی کردند. در این مطالعه مشاهده شد که شبح باکتریایی ظرفیت بالایی برای ورود به رده سلولی ملتحمه انسان داراست و هیچ گونه اثرسیتوتوکسینی روی این رده ندارد. علاوه براین ، 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 شبح 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 لنفوئید 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 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 لنفوئیدی میسر می‌سازند و به پیشبرد داروها ، واکسن‌ها و ژن‌درمانی‌ها در مقابل بیماری‌های مختلف چشمی در آینده کمک خواهد کرد. به نظر می‌رسد شبح 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 شبح 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 شبح باکتریایی بررسی شدند. سلول‌های Bowes حدود ۸۰درصد ژن نشان‌دار شده‌ای که توسط شبح باکتریایی به آن‌ها انتقال داده شده بود، را بیان کردند. این مطالعه نشان داد که سیستم شبح 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. باتوجه به اهمیت این ژن‌ها و آنزیم‌ها برای تغییر عملکرد سلول‌های سرطانی و فعال کردن دارو ها، به نظر اشباح باکتریایی سیستم مناسبی برای انتقال هستند.

ساخت واکسن

در مطالعه‌ای که ازسوی Arby Abtin و همکاران انجام شد،آثار اشباح باکتریایی به دست آمده از E.coli در تحریک سیستم ایمنی و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و پپتیدهای آنتی میکروبیال 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 پاسخ های سیستم ایمنی ذاتی و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شود. دراین 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 شبح باکتریایی، می‌تواند با تولید سایتوکاین‌ها سیستم ایمنی را بهتر تقویت کند.

در مطالعه‌ای که ازسوی طالب خان و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تهران انجام گرفت، از شبح 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 آنتی بادی اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری شده و کلونیزاسیون این باکتری را در معده کاهش می‌داد. Omp18 باعث القای تولید IL ،IL-10–۱۲و IFN-γ می‌شد که موش C57BL/6 را در برابر عفونت هلیکوباکتر پیلوری محافظت می‌کرد.(۴۰) واکسیناسیون‌های خوراکی، آنتی ژن‌های بسیار محافظت شده و ایمنی را به مخاط معده منتقل می‌کنند که به خاطر قدرت‌شان در ایجاد ایمنی مخاطی، به عنوان بهترین روش‌ها

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

در واکسیناسیون Hp شناخته می‌شوند. جدیدترین واکسن مورد استفاده در انسان شامل CagA، NapA و VacA می‌شود که پاسخ‌های سلول T خاصی را نمایان می‌کند. باوجود این موضوع، لیزات تمام سلولی که تمامی اجزای ایمنی Hp را شامل می‌شود به عنوان موثرترین واکسن شناخته می‌شود. Omp18 به عنوام یک پپتیدوگلیکان در معرض سطح، می‌تواند تولید IL-10 یک ترویج دهنده Th2 و IL-12 یک پیش‌نیاز Th1 را از سلول‌های دیندریتیک مغز استخوان به همراه ترشح IFN-γ 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 ازسوی Thomas Ebensen و همکاران انجام گرفت، از شبح باکتری منهمیا همولیتیکا به عنوان یک سیستم انتقال در ساخت واکسن استفاده شد. این شبح 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 شبح باکتریایی به عنوان یک سیستم انتقال DNA هستند.به نظرمی‌رسد شبح باکتریایی به عنوان یک ادجوانت باعث تقویت بلوغ و فعال‌سازی سلول‌های دندریتیک می‌شوند.در این بررسی توانایی شبح باکتریایی در تحریک تولید سایتوکاین توسط این سلول‌ها ارزیابی شد. به طوری که تولید IL-1α و IL-6 به ترتیب ۲,۴ و۶۱۵ بار بیشتر از سلول‌های دندریتیک تحریک نشده بود.(۲)

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

در مطالعه Hensel و همکارانش که روی آئروسل‌های اشباح باکتریایی اکتینوباسیلوس پلوروپنومونیه در خوک انجام دادند قطر این آئروسل ها ۳-۱ میکرومتر بود. در این مطالعه مشاهده شد خوک‌هایی که با این آئروسل‌ها 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 آئروسلی به عمق فضای آلوئولی به شمار می‌روند (۴۳،۴۲،۱۶). در این مطالعه به خوبی نشان داده شدکه استفاده از شبح 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 هپاتیت B به عنوان پروتئین فیوژن در OMP-A قرار داده شد و بر سطح اشباح باکتریایی، E.coli بیان شد. این شبح منجر به القای پاسخ ایمنی معناداری در برابر آنتی‌ژن ۱۴۹ هسته HBC در موش‌ها شد.(۴۵،۱۶) به نظر می‌رسد با این تکنیک بتوان آنتی ژن‌های ویروسی را روی شبح باکتریایی لود کرد و سلول‌های سیستم ایمنی را علیه عوامل ویروسی تقویت کرد.

Francis و همکارانش برای درمان عفونت‌های کلامیدیا تراکوماتیس از باکتری‌های شبح ویبریوکلرا استفاده کردند. این شبح باکتریایی اثر سمی ندارد و وسیله‌ای کارآمد برای انتقال محسوب می‌شوند و از ویژگی تحریک ایمنی قدرتمندی برخوردارند. پروتئین Omp که از پروتئین های غشایی کلامیدیااست، را در ویبریوکلرا بیان کردند و سپس با پروتئین E ایجاد BG کردند. در این مطالعه واکسن‌های چند زیر واحدی را با تک زیر واحدی مقایسه کردند. واکسن چند زیرواحدی در مقایسه با واکسن تک زیرواحدی از ایمنی‌زایی بهتری برخوردار بود که فراوانی بیشتر سلول‌های Th1 و قابلیت نسبتا بیشتری برای ایجاد ایمنی حفاظتی فراهم می‌کرد.(۴۶) موثرترین اقدام بلندمدت برای کنترل بیماری عفونی oculogenital در انسان استفاده از واکسنی کارآمد است که از باکتری Chlamidia trachomatis ناشی می‌شود. تعیین توالی ژنوم کلامیدیا چندین گزینه بالقوه را به عنوان واکسن 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 شبح ویبریوکلرا سمی نیستند و وسیله‌ای کارآمد برای ارسال محسوب می‌شوند و از ویژگی تحریک ایمنی‌قدرتمندی 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 واکسن‌های 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 زنانْ خطر مهمی را مطرح می‌کند و اغلب به بیماری التهابی لگن، بارداری خارج رحمی و ناباروری منجر می‌شود. ساخت و استفاده از واکسن پیشگیری کننده یا واکسن 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 واکسن‌های کلاسیک و حاوی سلول‌کامل به سمت واکسن‌هایی منجر شده‌است که حاوی عوامل بیماری‌زای سالم و زنده ولی تضعیف شده تاپیتیدها یا واکسن‌هایی زیرواحدی هستند. بنابراین ایجاد واکسن‌هایی بر اساس اجزای‌زیرواحدی‌کلامیدیایی کانون فعلی طراحی واکسن کلامیدیایی محسوب می‌شود. پروتئین غشای خارجی اصلی (MOMP(3 یکی از گزینه‌های برتر برای واکسن‌زیرواحدی است. این پروتئین ۴۰ kDa که قدرت ایمنی‌زایی بالایی دارد، به عنوان یک پورین، عامل چسبندگی، شاخصی اصلی برای حالت اختصاصی جنس و گونه کلامیدیا و به عنوان واکسنی بسیار نویدبخش به خوبی توصیف شده‌است. سایر کاندیدهای بالقوه برای ساخت واکسن در کمپلکس غشاء خارجی کلامیدیا تراکوماتیس عبارتند از پروتئین‌های غشای خارجی که از سیستئین غنی هستند. مانند OMP2 (60 kDa) و OMP3 (15 kDa).هرچند 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 وبحث

شبح باکتریایی(BGs) تمام ویژگی‌های مورفولوژیک، ساختاری، آنتی‌ژنی دیواره سلولی را دارا ست و به عنوان کاندید مناسبی برای تحریک سیتم ایمنی و واکسیناسیون، 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. درنتیجه وجود تکنیک‌های جدید که بتواند به صورت هدفمند دارو را به بافت سرطانی منتقل کند

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

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 دوگزوروبیسین (DOX) دردرمان خط سلولی سرطان روده بزرگ درانسان 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 Kudela و همکارانش کارآیی 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 باحامل‌های 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 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.

پیشنهادها:

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 حساس کننده‌های پرتویی لود شده در شبح باکتریایی استفاده کرد که باعث افزایش ضریب جذب حساس کننده پرتویی در بافت تومورال هدف شود.

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

منابع

1. Amara AA, Salem-Bekhit MM, Alanazi FK. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts. Sci World J. 20131-7.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. Pollock TJ, Tessman E, Tessman I. Identification of lysis protein E of bacteriophage phiX174. J Virol. 1978;28(1):408-10.

7. 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.

8. Markert A, Zillig W. Studies on the lysis of Escherichia coli C by bacteriophage φX174. Virology. 1965;25(1):88-97

9. 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.

10. 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.

11. Schön P, Schrot G, Wanner G, Lubitz W, Witte A. Two-stage model for integration of the lysis protein E of ΦX174 into the cell envelope of Escherichia coli. FEMS microbiol Rev. 1995;17(1-2):207-12.

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.

13. Panthel 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. Eko FO, Witte A, Huter V, Kuen B, Fürst-Ladani S, Haslberger A, Katinger

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 14:32 +0330 on Sunday September 22nd 2019

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. Virol J. 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 ϕX174 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 ϕX174 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 φX174 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, Esmaeili 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, Kravtzov AL, Livanova LF, Kutyrev 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.