



Medical Function of Bacterial Extracellular Vesicles

Maryam Ebrahimi Vargoorani^{1,2}, Mohammad Hossein Modarressi³, Mojgan Sheikhpour^{4,5}, Seyed Davar Siadat^{4,5}

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, College of Basic Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Medical Genetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5. Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/11/13
Accepted: 2018/07/15
Available online: 2018/10/11

Article Subject:

Clinical Microbiology

IJMM 2018; 12(3): 140-159

Corresponding author:

Seyed Davar Siadat

Department of
Mycobacteriology and
Pulmonary Research, Pasteur
Institute of Iran, Tehran, Iran

Tel: 09121442137

Email: d.siadat@gmail.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Extracellular vesicles are nanoscale particles which were identified about fifty years ago. The studies have shown that all of the gram-negative bacteria secrete extracellular vesicles during their normal growth. Today, the production of membrane vesicles has been reported by gram-positive bacteria, parasites, fungi, and mycobacteria. Since these nanoscale particles carry many of the bacterial components such as DNA, RNA, protein, endotoxin, and virulence molecules, they play a very important role in interacting with the environment and other bacteria. For this reason, many of these vesicles are considered as the transmission of pathogens, antigenic protein compounds, and the development of non-cellular vaccines, as well as drug delivery agents. The studies, have been carried in this field so far, have been focused on the pathogenic and physiological roles of these nanostructures in cross-species relationships. The focus of this article is on the role of extracellular bacterial vesicles and pathological and physiological functions which contribute to the interactions between bacteria and bacterium-host. Since these nanostructures play significant role in pathogenesis, gene transduction, regulation of gene expression, immune response regulation, and cellular signaling, further studies are needed on the medical application of these nanostructures as a new generation of vaccines, adjuvants, drug delivery agents.

Keywords: Extracellular vesicles; Adjuvants; Vaccine; Bacterium; Medical application

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ebrahimi Vargoorani M, Modarressi M H, Sheikhpour M, Siadat S D. Medical Function of Bacterial Extracellular Vesicles. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :140-159



عملکرد و کاربردهای پزشکی وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها

مریم ابراهیمی و رگورانی^{۱،۲}، محمد حسین مدرسی^۳، مژگان شیخ‌پور^{۴،۵}، سید داور سیادت^{۴،۵}

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۵. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

وزیکول‌های خارج سلولی، نانوساختارهای سلولی هستند که در حدود ۵۰ سال پیش شناسایی شدند. مطالعات نشان داده است که تقریباً همه باکتری‌های گرم منفی، طی رشد طبیعی خود، وزیکول‌های خارج سلولی را ترشح می‌کنند. امروزه تولید وزیکول‌های غشایی از سوی باکتری‌های گرم مثبت، انگل‌ها، قارچ‌ها و مایکوباکتری‌ها نیز گزارش شده است. از آنجایی که این ذرات نانومتری بسیاری از اجزای باکتریایی مانند DNA، RNA، پروتئین، اندوتوکسین و مولکول‌های ویروالانس را حمل می‌کنند، در تعامل با محیط و دیگر باکتری‌ها نقش بسیار مهمی دارند؛ به همین جهت بسیاری از این وزیکول‌ها در ارتباط با انتقال عوامل بیماری‌زا، ترکیبات پروتئینی آنتی‌ژنیک و توسعه واکسن‌های غیرسلولی و همچنین به‌عنوان انتقال‌دهنده‌های دارو مطرح هستند. مطالعات صورت گرفته در این زمینه تا به امروز بیشتر در ارتباط با نقش‌های بیماری‌زایی و فیزیولوژیکی این نانوساختارها در ارتباطات بین‌گونه‌ای بحث می‌کند. بر این اساس در این مقاله به نقش وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها و نیز عملکردهای پاتولوژی و فیزیولوژی که در میان کنش‌های بین باکتری‌ها و همین‌طور باکتری و میزبان نقش دارند، پرداخته خواهد شد. از آنجایی که وزیکول‌های خارج سلولی در بیماری‌زایی، انتقال افقی ژن، تنظیم بیان ژن، تنظیم پاسخ ایمنی و پیام‌رسانی سلولی نقش مؤثری دارند، مطالعات بیشتری در زمینه کاربرد پزشکی این نانوساختارها به‌عنوان نسل جدیدی از واکسن‌ها، ادجوانت‌ها و عوامل انتقال‌دهنده دارو مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: وزیکول‌های خارج سلولی، ادجوانت، واکسن، باکتری، کاربرد پزشکی

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۲۲
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹
موضوع:

میکروبی شناسی بالینی

IJMM1397;12(3): 140-159

نویسنده مسئول:

سید داور سیادت

بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو

پاستور، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۴۲۱۳۷

پست الکترونیک:

d.siadat@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

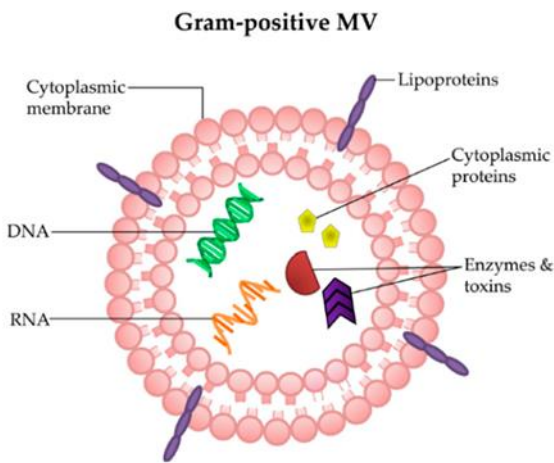
مقدمه

منفی‌ها و اکتوزوم و اگزوزوم درباره سلول‌های پستانداران است (۶).

وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی نخستین بار در سال ۱۹۶۰ در مطالعات ساختارهای باکتریایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده شدند (۷) (شکل ۱). این وزیکول‌های خارج سلولی قطری بین ۲۰۰-۲۰ نانومتر دارند و از بسیاری از باکتری‌های گرم منفی ترشح می‌شوند (۸-۱۲).

علاوه بر این وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی در شرایط محیطی مختلف کشف شدند؛ از جمله در شرایط آزمایشگاهی در داخل بیوفیلم (۱۵-۱۳)، به‌صورت آزاد و یا در

وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان اجزای تکاملی حفاظت شده بین سلولی هستند. همه انواع قلمروهای حیات روی زمین که شامل باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و یوکاریوت‌ها هستند، به شکل فعال وزیکول‌هایی با اندازه نانومتری ترشح می‌کنند (۱، ۲). این ساختارها گرد، دولایه و حاوی مواد فعال بیولوژیکی از جمله پروتئین، لیپید، اسیدنوکلئیک و متابولیت‌ها هستند (۳-۵). اصطلاحات متنوعی برای وزیکول‌های خارج سلولی در نظر گرفته می‌شود که شامل وزیکول‌های غشایی در ارتباط با باکتری‌های گرم مثبت و آرکی‌ها، وزیکول‌های غشای خارجی برای گرم



شکل ۲. ساختار و اجزای تشکیل‌دهنده وزیکول‌های خارج سلولی در باکتری‌های گرم مثبت

نقش وزیکول‌های خارج سلولی در باکتری‌ها

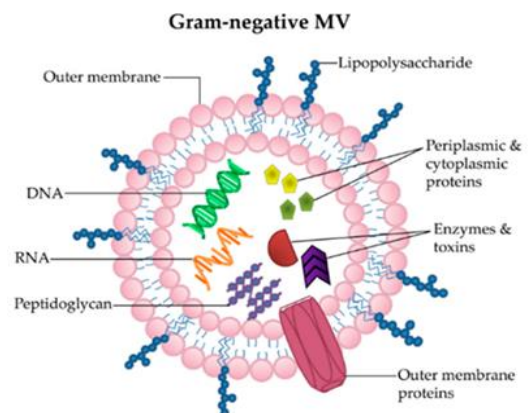
وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان سیستم ترشحی برای ترشح توکسین، آنزیم و عوامل بیماری‌زایی در باکتری‌ها می‌توانند عمل کنند (۲۱، ۲۲). از طرف دیگر این ساختارها می‌توانند بقای باکتری‌ها را افزایش دهند. مقاومت در برابر ترکیبات ضدباکتریایی می‌تواند با آزادسازی این وزیکول‌ها در همه مراحل رشد باکتری اتفاق بیفتد. در واقع تولید این وزیکول‌ها می‌تواند بقای باکتری‌ها را در زمانی که از سوی فاژها مورد حمله قرار می‌گیرند، افزایش دهد. همچنین این ساختارها می‌توانند مواد ضدباکتریایی همانند کمپلمان و آنتی‌بیوتیک‌ها را حذف کنند (۲۱، ۲۲، ۷). برخی از وزیکول‌های خارج سلولی محتوی آنزیم‌هایی همانند زایلاناز و سلولاز هستند که این امر می‌تواند مزیتی برای باکتری‌های تولیدکننده این وزیکول‌ها در راستای کسب مواد غذایی باشند (۲۱، ۲۳). وزیکول‌های خارج سلولی می‌توانند در بیماری‌زایی، کروم سنسینگ، کسب ماده غذایی و میان‌کنش‌های انگل و میزبان نقش داشته باشند. این نانوساختارها یک محیط محافظتی برای موادی همچون مولکول‌های کروم سنسینگ نظیر آهپتیل‌آهیدروکسی‌۴ کینولون (PQS) یا سیگنال کینولون سودوموناس) نیز هستند. علاوه بر این، DNA ژنومیک داخل وزیکول‌های خارج سلولی یافت می‌شود. از این پدیده می‌توان نتیجه گرفت که این ساختارها به عنوان سیستم انتقال DNA عمل می‌کنند (۷، ۲۴). غشای لیپیدی در اطراف وزیکول‌های غشایی سبب محافظت محتویات داخلی این ساختارها می‌شود. وزیکول‌های غشایی، محتویات خود را از تخریب توسط نوکلئازها (۲۵) محافظت می‌کنند؛ به طوری که خاصیت و

محیط‌های طبیعی همانند فاضلاب، خاک، مایعات بیولوژیکی و بافت‌ها، مایعات مغزی - نخاعی و خون و حتی در معده بیماران آلوده به *Helicobacter pylori* (۱۶، ۱۷).

وزیکول‌های خارج سلولی از باکتری‌های گرم منفی با جوانه‌زدن از غشای خارجی آزاد می‌شود و محتویات داخل این وزیکول‌ها از فضای پری پلاسمیک نشئت می‌گیرد (۱۹، ۱۸). به نظر می‌رسد که هیچ سد فیزیکی برای آزادسازی این وزیکول‌ها به فضای خارج سلولی وجود ندارد؛ اما از طرف دیگر به دلیل حضور دیواره ضخیم در باکتری‌های گرم مثبت، قارچ‌ها و مایکوباکترها پژوهش‌های ناچیزی در ارتباط با وزیکول‌های خارج سلولی صورت گرفته است زیرا تصور بر این بوده که این وزیکول‌ها از چنین سد‌های بزرگ نمی‌توانند عبور کنند.

برخلاف باکتری‌های گرم منفی دیواره باکتری‌های گرم مثبت حاوی پپتیدوگلیکان ضخیم هستند و همچنین غشای خارجی در این گروه از باکتری‌ها وجود ندارد. در سال ۱۹۹۰ ساختارهای شبیه وزیکول در باسیلوس گزارش شد (۲۰). به تازگی تولید این نانوساختارها در انواع دیگری از باکتری‌های گرم مثبت شرح داده شده است. وزیکول‌های خارج سلولی در باکتری‌های گرم مثبت بین ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر قطر دارند که قابل مقایسه با وزیکول‌های خارج سلولی مترشح‌ه از باکتری‌های گرم منفی هستند (شکل ۲). این وزیکول‌ها حاوی پروتئین‌های متنوعی هستند که برای بقا و ویروانس باکتری اهمیت دارند (۱).

رهای وزیکول‌های خارج سلولی سلول‌های یوکاریوتی در سال ۱۹۷۰ در قارچ‌ها، طی مطالعه پاتوژن فرصت طلب *Cryptococcus neoformans* با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد.



شکل ۱. ساختار و اجزای تشکیل‌دهنده وزیکول خارج سلولی در باکتری‌های گرم منفی

وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌توانند بقای باکتریایی را هم تحت تأثیر قرار دهند؛ برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی *P. aeruginosa*، پروتئین بتا لاکتاماز را حمل می‌کنند که به این وسیله می‌توانند بقای باکتری‌های دیگری که حساس به آنتی‌بیوتیک هستند را افزایش دهند (۳۱). علاوه بر این، وزیکول‌های خارج سلولی می‌توانند در مقاومت‌های چندداری هم نقش داشته باشند (۳).

وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی، بقای باکتری را به دلیل وجود مولکول‌های نجات‌دهنده افزایش می‌دهند. برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی *Moraxella catarrhalis* به بقای *Haemophilus influenzae* در مقابل حملات میانجی‌گرهای کمپلمان کمک می‌کنند (۳۲). به علاوه وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها با خارج کردن پروتئین‌هایی که ساختار خود را از دست داده‌اند، استرس‌های داخلی را کاهش می‌دهند (۳۳).

نقش وزیکول‌های خارج سلولی در میان‌کنش‌های باکتری - میزبان

میان‌کنش بین وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی با میزبان، منجر به پاسخ‌های متنوعی از جمله غیرایمونوژنیک تا پیش‌التهابی و یا سایتوتوکسیک بر حسب نوع سلول‌های هدف، گونه باکتریایی و مقدار وزیکول می‌شود (۱۷).

نقش وزیکول‌های خارج سلولی در اختلال ایمنی و ایجاد بیماری

از آنجایی که وزیکول‌های خارج سلولی پاسخ‌های ایمنی ذاتی را دچار اختلال می‌کنند، می‌توانند بیماری‌زایی باکتری را در میزبان سرعت بخشند. میان‌کنش‌های بین وزیکول‌های خارج سلولی و سلول‌های اپیتلیالی در سطح مخاط می‌تواند منجر به تخریب یکپارچگی سلول‌های اپیتلیالی شده و خود این عمل سبب بیماری‌زایی می‌شود. برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی به روش‌های متعددی مثل رافت‌های لیپیدی غنی از کلسترول وارد سلول‌های اپیتلیالی مخاط (در تعدادی از باکتری‌ها همانند *Porphyromonas*، *Helicobacter pylori* خارج سلولی و *P. aeruginosa* و *gingivalis*) شده و با تخریب یکپارچگی مخاط سبب بیماری‌زایی این گروه از باکتری‌ها می‌شوند (۳۴-۳۶).

سلول‌های اپیتلیالی انسان تعدادی از مولکول‌های پیش‌التهابی همانند IL-8 را در پاسخ به وزیکول‌های خارج سلولی ناشی از

فعالیت آنزیمی و خاصیت آنتی‌ژنی محتویات خود را در دمای ۴ درجه سلسیوس و دماهای بالاتر حفظ می‌کنند. در یک مطالعه نشان داده شد که آنزیم فسفودی استرازی که داخل وزیکول‌های غشایی *Escherichia coli* بسته‌بندی می‌شود، فعالیت آنزیمی خود را در مدت‌زمان طولانی و صبرابر بیشتر از فرم آزاد این آنزیم حفظ می‌کند. در مطالعه دیگر نشان داده شد که خاصیت آنتی‌ژنی وزیکول‌های غشایی *Neisseria meningitidis* در درجه حرارت ۴ درجه سلسیوس به مدت یک سال و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳ ماه حفظ می‌شود (۲۶). در واقع این مطالعات مقاومت طولانی مدت وزیکول‌های غشایی را روشن می‌سازد.

عملکردهای وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی

وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی عملکردهای پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی در ارتباطات باکتری - باکتری و باکتری - میزبان به واسطه محتویات داخل وزیکولی خود دارند (۲۸، ۲۷، ۲۵).

نقش وزیکول‌های خارج سلولی در ارتباطات باکتری - باکتری

باکتری‌ها از وزیکول‌های خارج سلولی خود در راستای ارتباط با سایر باکتری‌ها و همچنین تعدیل محیط میکروبی پیرامون خود استفاده می‌کنند. وزیکول‌های خارج سلولی سبب افزایش ارتباطات سلول به سلول و تنوع ژنتیکی از طریق انتقال افقی ژن می‌شوند (۲۸، ۲۹، ۷). در واقع وزیکول‌های خارج سلولی با روش‌های متنوعی سبب ارتباطات باکتری - باکتری می‌شوند؛ از جمله، وزیکول‌های خارج سلولی *Pseudomonas aeruginosa* نقش مهمی در انتقال یکی از مولکول‌های کروم‌سنسینگ به نام PQS دارند و این مولکول‌های PQS داخل وزیکولی می‌توانند با باکتری‌ها به صورت مستقیم از طریق LPS ارتباط برقرار کنند (۲۳).

وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی می‌توانند در تشکیل بیوفیلم و به عنوان ابزار رقابت‌کننده در باکتری‌ها عملکرد داشته باشند. وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها می‌توانند هم باکتری‌های گرم منفی و هم گرم مثبت را به کمک آنزیم تخریب‌کننده پپتیدوگلیکان از بین ببرند (۲۹). باکتری لیزوباکتر در داخل وزیکول‌های خود اندوپپتیداز L5 دارد که می‌تواند باکتری‌های رقابت‌کننده را از بین ببرد (۳۰).

تعدادی از الگوهای مولکولی در ارتباط با میکروارگانیسم همانند: لیپوپروتئین، DNA، RNA، لیپوپلی‌ساکارید و پپتیدوگلیکان هستند که می‌توانند با رسپتورهای شناسایی‌کننده الگو میزبان میان‌کنش دهند و نهایتاً منجر به القای پاسخ ایمنی ذاتی شوند (شکل ۱). برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی تولیدشده از سوی *H.pylori*، *Neisseria gonorrhoeae* و *P.aeruginosa* وارد سلول‌های اپیتلیالی میزبان می‌شوند و در نهایت از طریق رسپتور ایمنی سیتوپلاسمی NOD1 شناسایی می‌شوند که منجر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی ذاتی وابسته به وزیکول‌های خارج سلولی در رفتار وابسته به NOD1 خواهد شد (۳۶). به‌تازگی نشان داده شده است که وزیکول‌های خارج سلولی با رسپتورهای Toll-like بیان شده در سطح سلول‌های اپیتلیالی ارتباط برقرار می‌کنند و باعث القای پاسخ‌های التهابی در میزبان می‌شوند؛ به‌عنوان مثال وزیکول‌های خارج سلولی *Yersinia*، *Salmonella typhimurium* و *pseudotuberculosis* که پاسخ‌های التهابی از طریق TLR-4 را میانجی‌گری می‌کنند (۵۱). علاوه بر این، وزیکول‌های خارج سلولی می‌توانند از طریق TLR‌های سلول‌های ایمنی ذاتی سیگنال دهند تا بیماری‌زایی و التهاب را تنظیم کنند. برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی *P.gingivalis*، پاسخ‌های TNF α از سوی مونوسیت‌ها را در پاسخ وابسته به TLR-4 خنثی می‌کنند (۵۲). وزیکول‌های خارج سلولی *Bacteroides fragilis* محتوی پلی‌ساکاریدهای کپسولی است که می‌توانند از طریق TLR-2 با سلول‌های دندریتیک ارتباط برقرار کنند و تمایز سلول‌های T تنظیمی تولیدکننده IL-10 و حفاظت در برابر کویت ایجادشده را میانجی‌گری کنند (۵۳).

نقش وزیکول‌های خارج سلولی در تعدیل پاسخ‌های

ایمنی اکتسابی

تعدیل پاسخ‌های ایمنی اکتسابی علیه باکتری‌های بیماری‌زا با مکانیسم‌های مختلفی صورت می‌گیرد. اختلاف در توانایی وزیکول‌های خارج سلولی به‌منظور فعال یا سرکوب کردن پاسخ‌های ایمنی می‌تواند وابسته به محتویات آن باشد و دارای منشأ باکتریایی باشد. برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی *N.meningitidis* می‌توانند فعال شدن و تکثیر T-cell های CD4+ را مهار کنند و نوعی سرکوب ایمنی را در اطراف جایگاه عفونت ایجاد کنند (۵۴) و یا اینکه تکثیر سلول‌های CD4+ T cells را القا سازند (۵۵). این یافته‌های متناقض در سوبه‌های مختلف باکتریایی نشان می‌دهد که به

پاتوژن‌هایی مثل *H.pylori* (۳۷)، *Campylobacter jejuni* (۳۸) و *E.coli* (۳۹) تولید می‌کنند.

وزیکول‌های خارج سلولی و تعدیل سیستم ایمنی

میان‌کنش‌هایی که بین وزیکول‌های خارج سلولی و سلول‌های اپیتلیالی وجود دارد، می‌توانند مکانیسم‌های سلولی را تعدیل کنند و خود این پدیده می‌تواند مکانیسم‌های سلولی همانند آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) (۴۱، ۴۰)، تکثیر (۴۲) و در نهایت پاسخ‌های ایمنی را کنترل کند. *Cronobacter sakazakii* به‌عنوان یک عامل ایجادکننده مننژیت نوزادان و انتروکولیت، وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کند که از طریق سلول‌های اپیتلیالی ورود پیدا می‌کند و باعث القای تکثیر سلولی و ترشح IL-8 می‌شود و در نهایت بقای باکتری را سرعت می‌دهد (۴۳). علاوه بر این RNA باکتریایی که در وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌هایی مثل *E.coli* (۴۴)، *P.aeruginosa* (۴۵)، *P.gingivalis* (۴۶) و *Vibrio cholerae* (۴۷) وجود دارد توانایی تحریک سیستم ایمنی را در سلول‌های اپیتلیالی دارد. وزیکول‌های خارج سلولی که از سوی *اشریشیا کول* بسیار ویرولانته O104:H4 تولید می‌شوند، از طریق اندوسیتوز وارد سلول‌های اپیتلیالی دستگاه گوارش انسان شده و در نهایت منجر به القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۹ و تولید IL-8 می‌شوند (۴۰).

میان‌کنش وزیکول‌های خارج سلولی با سیستم ایمنی

ذاتی

با توجه به مطالعات صورت‌گرفته، معلوم شده است که وزیکول‌های خارج سلولی می‌توانند نقش مهمی در کشتار وابسته به کمپلمان باکتریایی داشته باشند؛ بنابراین می‌توانند بقای پاتوژن را در میزبان تسهیل کنند. وزیکول‌های خارج سلولی *V.cholerae* محتوی فاکتور ویرولانته ompU هستند که بقای این باکتری را از طریق کشته‌شدن به‌واسطه کمپلمان افزایش می‌دهند (۴۸).

وزیکول‌های خارج سلولی *P.gingivalis* محتوی آنزیم Peptidyl arginine deiminase است که عملکرد فاکتور کمپلمانی C5a را مختل می‌کند و این پدیده تهاجم *P.gingivalis* را تسریع می‌سازد (۴۹). وزیکول‌های خارج سلولی *N.meningitidis* به پنتاکسین ۳ متصل می‌شود که از جمله گلیکوپروتئین‌های فاز التهابی حاد است و در فعال شدن کمپلمان نقش دارد (۵۰). مطالعات اولیه مشخص کرد که وزیکول‌های خارج سلولی، حاوی

خارج سلولی *S.aureus* با پیشرفت درماتیت آتوپیک گزارش شد (۶۱). در مطالعه دیگر ثابت شد که وزیکول‌های خارج سلولی، فیبروبلاست‌های پوستی را فعال می‌کنند تا واسطه‌های پیش‌التهابی بیان شوند (۵۸). به‌علاوه خود وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* سبب ضخیم‌شدن اپیدرم و التهابی شبیه درماتیت آتوپیک می‌شوند (با افزایش نفوذ ائوزینوفیل‌ها و ماست سل‌ها). علاوه بر این مشاهده شد که آنتی‌بادی‌های IgE اختصاصی بر علیه وزیکول‌های خارج سلولی در بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک بیشتر از افراد سالم است. به‌تازگی Hong و همکاران نقش مهم آلفاهمولیزین وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* را در تخریب پوستی و درماتیت آتوپیک آشکار ساختند (۶۲). وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* هر دو نوع Th1 و Th17 را القا می‌کنند و باعث التهاب نوتروفیلی ریه می‌شوند و افزایش حساسیت مسیر تنفسی نسبت به انواعی از آلرژن‌ها را در پی خواهند داشت (۶۳). وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* حاوی بتالاکتاماز باعث بقای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساس به آمپی‌سیلین تحت حضور و فشار آمپی‌سیلین می‌شوند. علاوه بر *S.aureus* ATTC14458 (۶۴-۶۱) شواهد بیشتر نشان داد که گونه‌های آزمایشگاهی دیگر و ایزوله‌های کلینیکی *S.aureus* هم وزیکول‌های خارج سلولی در محیط کشت ترشح می‌کنند. مهم‌تر اینکه وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* در زخم بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک (۶۲) و هم در بافت ریه موش‌های آلوده به *S.aureus* مورد شناسایی قرار گرفتند (۶۵). در واقع همه این شواهد نشان می‌دهد که تولید وزیکول‌های خارج سلولی به‌صورت معمول اتفاق می‌افتد. علاوه بر نقش این وزیکول‌ها در میان‌کنش باکتری - میزبان وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* می‌توانند فعالیت سایتوتوکسیک بر بسیاری از سلول‌ها داشته باشند؛ مانند وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* که حاوی آلفاهمولیزین هستند و فعالیت سایتوتوکسیسیته بیشتری روی کراتینوسیت‌های انسانی و HaCaT نسبت به نوع محلول آلفاهمولیزین دارند (۶۲).

وزیکول‌های خارج سلولی دیگر باکتری‌های گرم مثبت

B. anthracis، باکتری تولیدکننده اسپور و مولد سیاه‌زخم در مهره‌داران است. رهاسازی وزیکول در *B. anthracis* نیز گزارش شده است. این وزیکول‌ها یک ساختار غشایی دولایه با قطر ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر دارند. اجزای توکسین آنتراکس که شامل آنتی‌ژن محافظتی، فاکتورکشنده، عامل ایجادکننده ورم و آنترولیزین

پژوهش‌های بیشتری در این زمینه نیاز است (۵۵). وزیکول‌های خارج سلولی *H.pylori* پاسخ‌های ایمنی را تعدیل می‌کنند؛ به طوری که تکثیر CD4+ T cells را مهار و باعث القای آپوپتوز می‌شود (۵۶). در مقابل وزیکول‌های خارج سلولی *Haemophilus Moraxella* می‌توانند سلول‌های B انسانی را فعال کنند (۵۷).

وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم مثبت

شواهدی مستقیم در ارتباط با تولید وزیکول‌های خارج سلولی در باکتری‌های گرم مثبت به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن و آنالیز پروتئومیکس وجود دارد (۱). در پژوهشی وزیکول‌های خارج سلولی باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* از سوپرناتانت جداسازی شد. این وزیکول‌های جداسازی‌شده گرد، دولایه و ساختارهای غشایی بسته با قطر ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر بودند (شکل ۲). علاوه بر این آنالیز پروتئومیکس، آشکار ساخت که وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* محتوی ۹۰ پروتئین وزیکولی است. این وزیکول‌ها حاوی پروتئین‌های ویروالنت خارج سلولی و یا در ارتباط با سطح همانند: بتالاکتاماز، کوآگولاز، همولیزین و پروتئین متصل‌شونده به IgG (SbI) هستند (۵۸).

مطالعات بیشتر در ارتباط با گونه‌های گرم مثبت، آشکار ساخت که *Listeria Streptomyces coelicolor Bacillus anthracis Streptococcus Clostridium perfringens monocytogenes Lactobacillus plantarum Streptococcus pneumoniae mutans* و *Lactobacillus casei* هم وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کنند (۱،۵۹،۶۰).

این مشاهدات بیان می‌کند که ترشح وزیکول‌های خارج سلولی یک پروسه کاملاً حفاظت‌شده تکاملی در باکتری‌های گرم مثبت است.

وزیکول‌های خارج سلولی استافیلوکوکوس اورئوس

بعد از کشف اولیه وزیکول‌های خارج سلولی استافیلوکوکوس اورئوس ATTC14458 که شامل بسیاری از پروتئین‌های ویروالنت و پاتوژنیک بود (۱)، نقش‌های عملکردی در میان‌کنش‌های باکتری - باکتری و باکتری - میزبان آنها در طول پنج سال گذشته گزارش شد. در سال ۲۰۱۱ برای نخستین بار ارتباط وزیکول‌های

ورود *L. monocytogenes* به سلول‌های اپیتلیال میزبان نیاز است؛ در حالی که لیستریولیزین O باعث لیز واکوئل‌ها می‌شود (۶۹).

لاکتوباسیلوس یک جنس از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری گرم مثبت است (۷۰). به‌طور کلی این باکتری، غیربیماری‌زا و بی‌خطر شناخته شده و به‌طور گسترده در غذاهای تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها تحت بررسی‌های گسترده آزمایشگاهی و کلینیکی ثابت شده است (۷۲، ۷۱). لاکتوباسیل‌ها، آپوپتوز القا شده (۷۳) از سوی سایتوکاین را مهار می‌کنند و همین‌طور بیماری‌زایی پاتوژن‌هایی همانند *E. coli* (۷۴) و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین (۷۵) را کاهش می‌دهند. لاکتوباسیلوس‌ها می‌توانند اثرات تعدیل‌کننده روی مکانیسم‌های مختلف داشته باشند؛ همانند اتصال مستقیم به C-type lectin receptors و یا Toll-like receptors در سطح سلول میزبان که یکی از مکانیسم‌های تعدیل‌کننده محسوب می‌شود (۷۷، ۷۶). برای مثال تجویز لاکتوباسیلوس کازئی CRL 431، بیان TLR2، TLR4، TLR9 را افزایش می‌دهد و تولید TNF α و IFN γ و IL-10 را بهبود می‌بخشد (۷۶). از طرف دیگر لاکتوباسیل‌ها مواد ضد میکروبی را تولید می‌کنند که رشد پاتوژن‌های مختلف را مهار می‌کنند؛ برای مثال باکتریوسین ترشح‌شده از سوی لاکتوباسیل‌ها باعث ایجاد منفذ در غشای پاتوژن‌ها و در نهایت منجر به نشت سلول هدف می‌شود (۷۸، ۷۹). امروزه مطالعات ثابت کرده است که وزیکول‌های خارج سلولی لاکتوباسیل‌ها و پروتئین‌های مربوط به آنها می‌توانند فعالیت سلول‌های ایمنی را تعدیل کرده و پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحت‌تأثیر قرار دهند (۸۱، ۸۰). برای مثال وزیکول‌های خارج سلولی لاکتوباسیل‌ها پاسخ‌های سلولی TLR2/1 و TLR4 را افزایش می‌دهند در حالی که انتقال سیگنال TLR2/6 را مهار می‌کنند (۸۲).

در مطالعه‌ای پژوهشگران دریافتند که وزیکول‌های خارج سلولی *Lactobacillus plantarum* توانایی افزایش بیان ژن‌های دفاعی میزبان را دارد؛ به طوری که می‌توان از وزیکول‌های خارج سلولی این باکتری در درمان *Enterococcus faecium* مقاوم به ونکومایسین استفاده کرد (۸۳).

در پژوهش دیگری ثابت شد که وزیکول‌های خارج سلولی باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* می‌توانند به سلول‌های اپیتلیالی روده نفوذ کرده و پاسخ‌های آلرژیک نسبت به مواد غذایی را کاهش دهد (۸۴).

هستند، در وزیکول‌های غشایی *B. anthracis* شناسایی شده‌اند (۵۹). بر این اساس مطالعات نشان داده است که موش‌های ایمن شده با وزیکول‌های *B. anthracis* در برابر این باکتری، ایمن می‌شوند (۵۹).

Mycobacterium ulcerans باکتری‌ای با رشد کند است که پوست و بافت‌های زیرجلدی را درگیر می‌کند و به‌عنوان یک عامل اتیولوژیک از زخم Buruli است. مایکولاکتون به‌عنوان تنها فاکتور ویروانس ایجادکننده زخم Buruli است (۶۶).

M. ulcerans بیوفیلمی از ماتریکس خارج سلولی تشکیل می‌دهد که این ماتریکس حاوی وزیکول و مایکولاکتون است. وزیکول‌های حاصل از *M. ulcerans* فعالیت سایتوتوکسیک دارد که به نظر می‌رسد به‌دلیل حضور مایکولاکتون در این وزیکول‌ها است (۶۷). Prados-Rosales و همکاران (۲۰۱۱)، کشف کردند که سوبه‌های مایکوباکتریوم ویروالانت و غیرویروالانت مانند *Mycobacterium tuberculosis*، *Mycobacterium bovis* و *Mycobacterium phlei*، *Mycobacterium Kansasii* و *Mycobacterium avium* وزیکول‌های غشایی آزاد می‌کنند. آنالیز پروتئومیکس آشکار ساخت که فقط وزیکول‌هایی از *M. bovis* و *M. tuberculosis* غنی از پروتئین‌هایی در ارتباط با فاکتور ویروالانت هستند؛ زیرا این وزیکول‌ها حاوی لیگاندهای TLR2 همانند لیپوپروتئین ۱۹ کیلودالتونی، LprA، LprG هستند. میان‌کنش وزیکول‌های غشایی با ماکروفاژهای موش باعث القای سایتوکاین و کموکاین از طریق مسیر وابسته به TLR-2 می‌شوند (۶۸).

Listeria monocytogenes یک باکتری بیماری‌زای انتقال‌یابنده از طریق غذا است که نسبت به استرس‌های محیطی مختلف مقاومت دارد. به‌تازگی آزادسازی وزیکول‌های خارج سلولی از این باکتری گزارش شده است. یک موتانت از این باکتری در ارتباط با این پرسش که آیا فاکتور رونویسی مربوط به شرایط استرس σ_B ، تولید وزیکول‌های غشایی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد یا خیر مورد بررسی قرار گرفت. *L. monocytogenes* وحشی و موتانت σ_B ، وزیکول‌هایی از ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر را تولید می‌کنند. وزیکول‌های غشایی خالص‌شده توسط LC-ESI-MS/MS آنالیز شدند. ۱۳۰ پروتئین در وزیکول‌های غشایی سوبه وحشی و ۱۸۰ پروتئین به‌عنوان پروتئین‌های وابسته به σ_B در *L. monocytogenes* تحت شناسایی قرار گرفت. اینترنالین B و لیستریولیزین O در وزیکول‌های غشایی شناسایی شدند و مشخص شد که هم در سوبه وحشی و هم سوبه موتانت، اینترنالین B برای

وزیکول‌های خارج سلولی پاتوژن‌های غیرباکتریایی

امروزه شواهد قطعی در ارتباط با اینکه باکتری‌های گرم مثبت، قارچ‌ها و مایکوپلاسماها وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کنند وجود دارد این وزیکول‌ها در دسترس بوده و از نظر بیولوژیکی فعال هستند و در بیماری‌زایی بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند (۸۵).

پاتوژن‌های غیرباکتریایی هم وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کنند که عامل بیماری‌زایی هستند. *Trichomonas vaginalis* وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کند که وارد سلول‌های اکتوسرویکال شده، باعث القای تولید IL-6 و IL-8 می‌شوند و اتصال انگل به سلول‌های میزبان را تسریع می‌کنند (۸۶).

وزیکول‌های خارج سلولی *Trypanosoma brucei*، پروتئین‌های مقاومت سرمی را به دیگر تریپانوزوما انتقال می‌دهند و کم‌خونی را در میزبان القا می‌کنند (۸۷).

سلول‌های یوکاریوتیک که به وسیله پاتوژن‌های داخل سلولی آلوده می‌شوند نیز می‌توانند وزیکول‌های خارج سلولی تولید کنند که شامل اجزایی از پاتوژن و میزبان باشند. اگرچه بسیاری از وزیکول‌های مشتق از میزبان - پاتوژن وجود دارد اما همه آنها وزیکول‌های خارج سلولی نامیده می‌شوند.

انگل‌هایی مثل *Plasmodium falciparum* هم می‌توانند سبب تولید وزیکول‌های خارج سلولی از سلول‌های آلوده میزبان شوند. وزیکول‌های خارج سلولی *P.falciparum* حاوی پروتئین‌های تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، پروتئین‌های لازم برای تهاجم به سلول میزبان و پروتئین‌های ارتباط‌دهنده سلول به سلول هستند (۸۸). علاوه بر این وزیکول‌های خارج سلولی آزاد شده از *P.falciparum* که گلبول‌های قرمز خون را آلوده می‌کنند، می‌توانند به عنوان مکانیسم ارتباط سلول به سلول و انتقال پلاسمید بین انواعی از انگل‌ها باشند (۸۹).

کاربردهای مهم پزشکی وزیکول‌های خارج سلولی

وزیکول‌های خارج سلولی کاربردهای پزشکی متنوعی برای انسان می‌توانند داشته باشند. یکی از کاربردهای مهم پزشکی وزیکول‌های خارج سلولی استفاده از این نانوساختارها به عنوان واکسن است.

وزیکول‌های خارج سلولی به عنوان نسل جدیدی از

واکسن و ادجوانت

امروزه به دلیل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی گسترده تقاضای بیشتری در راستای تولید نسل جدیدی از واکسن‌ها وجود دارد. ترکیبات تولیدشده براساس وزیکول‌های خارج سلولی به سبب ویژگی‌های ایمونولوژیکی که دارند، به عنوان کاندید مناسبی برای واکسن مطرح هستند.

Raeven و همکاران (۲۰۱۵) پاسخ‌های ایمنی ایجادشده از وزیکول‌های خارج سلولی *B. pertussis* را بررسی کرده و در سال ۲۰۱۶ با توجه به نتایج کسب‌شده، واکسن‌های کامل کشته‌شده (*Bordetella pertussis* whole-cell, killed antigen) را با واکسن‌هایی براساس وزیکول‌های خارج سلولی مقایسه کردند. در هر دو مطالعه ثابت شد که پاسخ ایمنی مؤثری ایجاد می‌شود (۹۱). در مطالعه‌ای که Zariri و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند، فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی از سوی وزیکول‌های خارج سلولی *N. meningitidis* اثبات شد (۹۲).

Choi و همکاران (۲۰۱۵) از وزیکول‌های خارج سلولی *S.aureus* علیه عفونت‌های استافیلوکوکی ریه استفاده کردند؛ به طوری که واکسیناسیون موش‌ها با وزیکول‌های غشایی *S.aureus* منجر به پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال شد. علاوه بر این، با توجه به ویژگی‌های ادجوانتی این وزیکول‌ها، به افزایش ادجوانت‌های اضافی که می‌توانند اثرات جانبی مخرب داشته باشند، نیازی نیست. از آنجایی که محدودیت ادجوانت مناسب برای انسان وجود دارد، ویژگی‌های ادجوانتی این وزیکول‌ها آنها را به عنوان واکسن مؤثر و مفید نسبت به دیگر واکسن‌ها مطرح می‌کند (۹۳). Mcconnel و همکاران (۲۰۱۱) از وزیکول‌های خارج سلولی *Acinetobacter baumannii* به عنوان واکسن غیرسلولی استفاده کردند. در این مطالعه ثابت شد که پاسخ‌های ایمنی مؤثری در مدل‌های حیوانی ایجاد می‌شود (۹۴). Muralinath و همکاران (۲۰۱۱) از وزیکول‌های خارج سلولی برای انتقال پروتئین pspA به منظور ایمنی‌زایی علیه *Streptococcus pneumoniae* استفاده کردند. در این پژوهش پاسخ‌های ایمنی به شکل مؤثری القا شد (۹۵). Schild و همکاران (۲۰۰۸) از وزیکول‌های خارج سلولی *V. cholerae* برای ایمنی‌زایی موش‌های ماده استفاده کردند و سطح قابل‌قبولی از آنتی‌بادی IgA را مشاهده کردند (۹۶). Nakao و همکاران (۲۰۰۶) از وزیکول‌های خارج سلولی *P. gingivalis* به عنوان آنتی‌ژن واکسن در راستای ایمنی‌زایی موش‌های BALB/c

به‌عنوان یک گزینه مناسب برای درمان سرطان مطرح می‌کند (۱۰۸، ۱۰۷). شیمی‌درمانی در حال حاضر همه سلول‌های بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در نهایت منجر به اثرات جانبی شدید و طولانی‌مدت می‌شود (۱۰۹). علاوه بر این برای از بین بردن همه سلول‌های سرطانی یک دوز بالایی از شیمی‌درمانی لازم است. برای رسیدن به این هدف که حتما همه سلول‌های سرطانی از بین بروند، می‌توان از سیستم تحویل‌دهنده دارویی وزیکول‌های غشایی استفاده کرد (۱۱۰). وزیکول‌های غشایی مزایای بسیاری برای درمان سرطان دارند. این وزیکول‌ها مانند غشاهای محافظت‌کننده می‌توانند محتویات وزیکول‌های غشایی را از تخریب‌های نوکلئازی و پروتئازی حفاظت کنند؛ بنابراین می‌توانند نیمه عمر دارو را افزایش دهند. علاوه بر این هدفمند کردن این وزیکول‌ها تحویل دارو را به بافت مدنظر آسان کرده و با این روش می‌توان از اثرات سمی عوامل دارویی به بافت‌هایی که دلخواه ما نیست جلوگیری کرد (۱۰۷). داروهای ضدسرطانی حمل‌شده از طریق این وزیکول‌ها می‌تواند منجر به درمان تومور با اثرات سمی پایین شود (۱۰۷). Gujrati و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با نقش بالقوه وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی به‌عنوان یک گزینه مناسب انتقال‌دهنده دارو در درمان سرطان پژوهشی را ترتیب دادند و اثربخشی این نانوساختارها بدون اثرات جانبی مخرب را گزارش کردند (۱۱۱). Kim و همکاران (۲۰۱۷) از نانوزیکول‌های مشتق از پروتوپلاست باکتری در راستای انتقال مواد شیمی‌درمانی مثل doxorubicine استفاده کردند و این نانوذرات را به‌عنوان نسل جدید و کارآمد برای انتقال مواد شیمی‌درمانی معرفی کردند (۱۱۲). Alves و همکاران (۲۰۱۵) از وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان عوامل تحویل‌دهنده دارویی (بسته‌بندی اپی‌توپ‌های نوترکیب) بهره بردند (۱۱۳). در سال ۲۰۱۷ پژوهشگران نشان دادند زمانی که وزیکول‌های با اندازه نانومتری در بافت توموری تجمع پیدا می‌کنند، پاسخ‌های ضدتوموری مثل تولید IFN- γ القا می‌شوند (۱۰۸). نکته جالب‌توجه در این مطالعه این است که از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری به‌عنوان واکسن و عوامل انتقال دهنده دارو در درمان سرطان استفاده نشده، بلکه از آنجایی که این نانوساختارها دارای اپی‌توپ‌های پروتئینی خاصی هستند پاسخ‌های ضدتوموری مثل تولید IFN- γ را القا می‌کنند.

با توجه به مطالعات صورت‌گرفته، وزیکول‌های خارج سلولی به‌دلیل داشتن غشای محافظت‌کننده و اندازه نانومتری و قابلیت هدفمند شدن به‌عنوان نسل جدید و کارآمدی از انتقال‌دهنده دارو می‌توانند استفاده کنند.

بهره بردند؛ به‌طوری که در موش‌های ایمن‌شده با این واکسن میزان بالایی از آنتی‌بادی اختصاصی یافت شد (۹۷). در مطالعه‌ای که Watkins و همکاران انجام دادند، وزیکول‌های خارج سلولی از *E. coli* به یک کایمر شامل پروتئین clyA و پروتئین ماتریکس آنفلوآنزا که یک پروتئین بسیار محافظت‌شده روی سطح ویروسی است، متصل شد. این واکسن نوترکیب بدون نیاز به ادجوانت باعث تولید سطح بالایی از IgG می‌شود و می‌تواند محافظت کاملی علیه آنفلوآنزای کشنده PR8 ایجاد کند. همچنین این واکسن موجب محافظت علیه دو سویه آنفلوآنزا H3N2 و H1N1 هم می‌شود (۹۸، ۹۹). Huang و همکاران (۲۰۱۶) از وزیکول‌های خارج سلولی *E. coli* به‌عنوان انتقال‌دهنده آنتی‌ژن که ایجاد ایمنی علیه عفونت‌های *A. baumannii* می‌کند، بهره بردند (۱۰۰). Hasrris و همکاران (۲۰۱۷) اثربخشی واکسن‌های بر پایه وزیکول‌های خارج سلولی منگوکوک را علیه گونه‌آ گزارش کردند (۱۰۱). در پژوهشی Watkins و همکاران از وزیکول‌های خارج سلولی نوترکیب *E. coli* برای ایمنی علیه آنفلوآنزا بهره گرفته و اثربخشی و ایمنی این نوع واکسن را گزارش کردند (۹۹). در سال ۲۰۱۸ پژوهشگران ثابت کردند که واکسیناسیون با وزیکول‌های خارج سلولی *P. aeruginosa* باعث القای پاسخ ایمنی در موش می‌شود (۱۰۲).

توانایی این وزیکول‌ها در فعال کردن سیستم ایمنی ذاتی، آنها را تبدیل به ادجوانت‌های مؤثری برای واکسن‌های دیگر کرده است. ادجوانت‌های معمول مثل آلوم، توکسین کلرا و دیفتری، اغلب اثراتی همانند التهاب و تحریک ضعیف ایمنی مخاطی را ایجاد می‌کنند (۱۰۴، ۱۰۳). علاوه بر این، از آنجایی که وزیکول‌های غشایی در القای ایمنی مخاطی و سلولی بسیار مؤثر هستند، به عنوان ادجوانت برای واکسن‌های غیرفعال، زنده و آنتی‌ژن‌های خالص مورد تحقیق قرار گرفته‌اند. Siadat و همکاران (۲۰۱۱) و Salmani و همکاران (۲۰۰۹) از وزیکول‌های خارج سلولی *N. meningitidis* سرگروه B به‌عنوان ادجوانت استفاده کردند (۱۰۶، ۱۰۵).

وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان سیستم تحویل

دهنده دارویی

استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها به‌عنوان سیستم انتقال‌دهنده (Delivery system) از جمله کاربردهای پزشکی مهم دیگر این نانوساختارها است. توانایی وزیکول‌های غشایی مهندسی‌شده برای هدف قرار دادن سلول‌های خاص آنها را



تولید وزیکول‌های خارج سلولی نو ترکیب

سهولت نسبی تغییر باکتری‌ها منجر به توسعه وزیکول‌های خارج سلولی نو ترکیب می‌شود. از این ویژگی می‌توان در راستای تولید وزیکول‌های خارج سلولی با محتویات خاص استفاده کرد. یکی از اجزای وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی لیپوپلی ساکارید (LPS) است. LPS از اجزای توکسیک باکتری‌های گرم منفی محسوب می‌شود که می‌تواند منجر به شوک سپتیک شود (۱۱۴)؛ بنابراین برای استفاده کاربردی وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان واکسن، ادجوانت، و عوامل تحویل‌دهنده باید با دستکاری ژنتیکی، سویه‌ای از باکتری تولید شود که وزیکول‌های خارج سلولی آن خاصیت سمی خود را از دست بدهد. این راهکار در راستای تولید واکسن از *E. coli* و *N. meningitidis* کاربرد دارد (۱۱۵). Van Der Ley و همکاران (۲۰۰۱)، موتانتی از *N. meningitidis* را ایجاد کردند که وزیکول‌های خارج سلولی آن خاصیت ادجوانتی خود را حفظ کرده بود؛ در حالی که به دلیل داشتن *lpxL1* اثرات سمی لیپوپلی ساکارید کاهش یافته بود (۱۱۶). این تغییرات در سویه‌ها باعث ایجاد وزیکول‌های خارج سلولی با خاصیت سمی کم می‌شود. Muralinath و همکاران (۲۰۱۱) از وزیکول‌های خارج سلولی *Salmonella enterica* مهندسی شده برای بیان پروتئین *S. pneumoniae pspA* استفاده کردند (۹۵).

امروزه وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان ابزار جدید درمانی شناخته شده‌اند؛ به طوری که می‌توانند عناصر ویرایش ژنی (CRISPR/Cassett) را به سلول‌های انسانی اعطا کنند (۱۱۷).

بحث و نتیجه‌گیری

وزیکول‌های خارج سلولی را انواعی از باکتری‌ها ترشح می‌کنند. محتویات داخل این نانوساختارها بستگی به منشأ تولیدکننده آنها دارد. امروزه استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان واکسن، انتقال‌دهنده دارو و ادجوانت بسیار مورد توجه قرار گرفته است؛ مثلاً در ارتباط با تولید واکسن به دلیل داشتن انواعی از آنتی‌ژن‌های میکروبی توانایی تحریک ایمنی ذاتی و اکتسابی را دارند.

مطالعاتی که در ارتباط با کاربرد وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان واکسن انجام شده است نشان داده‌اند که این مدل واکسن‌ها دارای اثرات محافظتی بالا و با کمترین اثر جانبی می‌باشند مثلاً واکسن‌های قدیمی که علیه *B. pertussis* استفاده می‌شدند به‌صورت عمده باعث بیماری‌های عصبی حاد در کودکان می‌شدند به دلیل همین اثرات مخرب رویکرد به سمت

واکسن‌های نسل سوم براساس وزیکول‌های خارج سلولی این باکتری رفته است (۹۰). روش‌های قدیمی طراحی واکسن، معمولاً استفاده از یک آنتی‌ژن محافظت‌کننده بود؛ اما با توجه به اینکه وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها حاوی آنتی‌ژن‌های متعددی هستند، می‌توانند تولید آنتی‌بادی‌های متفاوت که هم‌زمان ویژگی محافظت‌کنندگی نیز دارند را تحریک کنند. در واقع این مسئله یکی از مزیت‌های استفاده از این نانوذرات در طراحی واکسن است. از موارد بحث‌برانگیز در استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی به‌عنوان واکسن، وجود LPS است؛ اما با توجه به مطالعاتی که در این ارتباط صورت گرفته، این محدودیت با استفاده از دترجنت و یا تغییر ژنتیکی رفع شده است. از طرف دیگر پژوهش‌های کاملی درباره این نانوساختارها به‌عنوان واکسن‌های غیرسلولی مؤثر برای استفاده کلینیکی در انسان صورت نگرفته است و این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری دارد. یک مسئله دیگر که نیاز به پژوهش‌های بیشتری در ارتباط با وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان واکسن دارد، این است که آیا آنتی‌ژن‌های محافظت‌کننده باید در سطح وزیکول‌های خارج سلولی قرار بگیرد و یا اینکه به‌عنوان یکی از اجزای داخل این نانوساختارها باشد.

از مزیت‌های استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها به‌عنوان واکسن، ویژگی ادجوانتی این نانوساختارها است. این واکسن‌ها بدون نیاز به ادجوانت‌های خارجی، هر دو پاسخ ایمنی سلولی و همورال را القا می‌کنند و مهم‌تر اینکه ادجوانت‌های خارجی مثل آلوم که تأیید شده برای استفاده روی انسان است، توانایی محدودی در تحریک پاسخ‌های ایمنی *Th1* دارند. اما فعال‌سازی این رده سلولی علیه بسیاری از پاتوژن‌ها مهم است و از طرفی نگرانی‌هایی در ارتباط با اثرات جانبی و مخرب ادجوانت‌های خارجی مثل آلوم مطرح است. بنابراین مطالعات بیشتر و نیاز شدیدتری به ادجوانت‌های مؤثر و ایمن برای استفاده در انسان وجود دارد که بتواند هم‌زمان ایمنی سلولی *Th1* را تحریک کند. با توجه به پیشرفت علم و رویکرد جدید درباره استفاده از مولکول‌های طبیعی به‌عنوان حامل، از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها می‌توان در این ارتباط بهره برد (۱۱۸).

استفاده از شیمی درمانی اثرات جانبی متعددی (از جمله اسهال، استفراغ، ریزش مو و مشکلات خونی) دارد؛ زیرا داروها فقط به سلول‌های هدف که سلول‌های سرطانی هستند، تحویل داده نمی‌شوند. همان‌طور که اشاره شد وزیکول‌های خارج سلولی با اندازه نانومتری خود، یک گزینه مناسب در زمینه کاربرد در

به شکل طبیعی از باکتری تولیدکننده ترشح می‌شوند، بسیار متفاوت است.

با توجه به پتانسیل وزیکول‌های خارج سلولی در انتقال مولکول‌های عملکردی به سلول‌های اپیتلیالی روده و تعامل با سیستم ایمنی میزبان، امکان واکسیناسیون انسان و حیوان به روش خوراکی با این نانوساختارها بسیار زیاد است. از طرف دیگر استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌ها در بیوتکنولوژی یکی از موضوعات جالب توجه است؛ به همین منظور از وزیکول‌های خارج سلولی می‌توان برای انتقال ترکیبات غذایی مؤثر بهره برد. بر این اساس وزیکول‌های خارج سلولی حاوی ترکیبات مؤثر (انواعی از ویتامین‌ها) می‌توانند به‌عنوان مکمل‌های غذایی برای ارتقای سلامتی مصرف شوند.

علاوه بر کاربرد وزیکول‌های خارج سلولی به‌عنوان واکسن، ادجوانت، و سیستم تحویل‌دهنده از این نانوساختارهای باکتریایی می‌توان برای اهدافی مثل زیست‌پالایی، اهداف تشخیصی و درمانی هم بهره برد. برای همین منظور به مطالعات و پژوهش‌های گسترده‌ای در ارتباط با این نانوساختارها نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان، از تمامی پژوهشگرانی که از مقالات آنها به عنوان منابع استفاده شده است، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*. 2009;9(24):5425-36. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338> PMID:19834908
- Soler N, Marguet E, Verbavatz J-M, Forterre P. Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Res Microbiol*. 2008;159(5):390-9. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.015> PMID:18625304
- Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev*. 2008;27(6):535-55. <https://doi.org/10.1002/mas.20175> PMID:18421767
- Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-6. <https://doi.org/10.1038/ncb1800> PMID:19011622 PMID:PMC3423894
- Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics of extracellular vesicles: exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom*

- Rev. 2015;34(4):474-90.
<https://doi.org/10.1002/mas.21420>
PMID:24421117
6. Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D-s, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(1):20384.
<https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384>
PMID:24009897 PMCID:PMC3760654
 7. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:163-84.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.09120.8.073413> PMID:20825345
PMCID:PMC3525469
 8. Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*. 2007;7(17):3143-53.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200700196>
PMID:17787032
 9. Choi DS, Kim DK, Choi SJ, Lee J, Choi JP, Rho S, et al. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics*. 2011;11(16):3424-9.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201000212>
PMID:21751344
 10. Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss JP. Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38383-94.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M508063200>
PMID:16103114
 11. Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, et al. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. 2003;115(1):25-35.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00754-2)
 12. Kwon S-O, Gho YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297(2):150-6.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x> PMID:19548894
 13. Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol*. 2006;188(16):5945-57.
<https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
PMID:16885463 PMCID:PMC1540058
 14. Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res*. 2012;11(10):4906-15.
<https://doi.org/10.1021/pr300395j>
PMID:22909304
 15. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, et al. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2009;9(1):197.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
PMID:19751530 PMCID:PMC2749055
 16. Namork E, Brandtzaeg P. Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet*. 2002;360(9347):1741.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11721-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11721-1) PMID:12480427
 17. Ünal CM, Schaar V, Riesbeck K, editors. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Seminars in immunopathology*. New York: Springer; 2011.
 18. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*. 2005;19(22):2645-55.
<https://doi.org/10.1101/gad.1299905>
PMID:16291643
 19. Kulkarni HM, Jagannadham MV. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 2014;160(10):2109-21.

- <https://doi.org/10.1099/mic.0.079400-0>
PMID:[25069453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25069453/)
20. Dorward DW, Garon CF. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(6):1960-2. PMID:[16348232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16348232/) PMCID:PMC184538
 21. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(10):605-19. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525> PMID:[26373371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373371/) PMCID:PMC5308417
 22. Kuehn MJ. Secreted bacterial vesicles as good Samaritans. *Cell Host Microbe.* 2012;12(4):392-3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.005> PMID:[23084908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23084908/)
 23. Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature.* 2005;437(7057):422-5. <https://doi.org/10.1038/nature03925> PMID:[16163359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16163359/)
 24. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology.* 2004;150(7):2161-9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0> PMID:[15256559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256559/)
 25. Kolling GL, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157: H7. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(5):1843-8. PMID:[10223967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10223967/)
 26. Arigita C, Jiskoot W, Westdijk J, van Ingen C, Hennink WE, Crommelin DJ, et al. Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine.* 2004;22(5):629-42. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.08.027>
 27. Mashburn-Warren LM, Whiteley M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2006; 61(4):839-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05272.x> PMID:[16879642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16879642/)
 28. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(1):81-94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09> PMID:[20197500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20197500/) PMCID:PMC2832350
 29. MacDonald IA, Kuehn MJ. Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res Microbiol.* 2012;163(9):607-18. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.020> PMID:[23123555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23123555/)
 30. Vasilyeva NV, Tsfasman IM, Suzina NE, Stepnaya OA, Kulaev IS. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *The FEBS J.* 2008;275(15):3827-35. <https://doi.org/10.1111/j.17424658.2008.06530.x> PMID:[18573103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18573103/)
 31. Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Høiby N. Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 45(1): 9-13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9> PMID:[10629007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10629007/)
 32. Thuan Tong T, Mörgelin M, Forsgren A, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae* survival during complement-mediated attacks is promoted by *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles. *J Infect Dis.* 2007;195(11):1661-70. <https://doi.org/10.1086/517611> PMID:[17471436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17471436/)
 33. McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol.* 2007;63(2):545-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x> PMID:[17163978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17163978/)
 34. Bomberger JM, MacEachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton

- BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000382.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>
PMID:19360133 PMCID:PMC2661024
35. Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun.* 2009;77(10):4187-96.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00009-09>
PMID:19651865 PMCID:PMC2747946
36. Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman HA, Parkington HC, et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010;12(3):372-85.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01404.x> PMID:19888989
37. Ismail S, Hampton MB, Keenan JJ. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun.* 2003;71(10):5670-5.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5670-5675.2003> PMID:14500487
38. Elmi A, Watson E, Sandu P, Gundogdu O, Mills DC, Inglis NF, et al. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2012;80(12):4089-98.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00161-12>
PMID:22966047 PMCID:PMC3497446
39. Rolhion N, Barnich N, Bringer M-A, Glasser A-L, Ranc J, Hébuterne X, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut.* 2010;59(10):1355-62.
<https://doi.org/10.1136/gut.2010.207456>
PMID:20587550 PMCID:PMC2976078
40. Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Glüder M, Kemper B, et al. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104: H4 outbreak strain. *Sci Rep.* 2015;5:13252.
<https://doi.org/10.1038/srep13252>
41. Mondal A, Tapader R, Chatterjee NS, Ghosh A, Sinha R, Koley H, et al. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 2016;84(5):1478-90.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01365-15>
PMID:26930702 PMCID:PMC4862697
42. Li Z-T, Zhang R-L, Bi X-G, Xu L, Fan M, Xie D, et al. Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. *Microb Pathog.* 2015;81:46-52.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.03.009> PMID:25773772
43. Alzahrani H, Winter J, Boocock D, De Girolamo L, Forsythe SJ. Characterization of outer membrane vesicles from a neonatal meningitic strain of *Cronobacter sakazakii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(12):fnv085.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnv085>
PMID:26023200
44. Ghosal A, Upadhyaya BB, Fritz JV, Heintz-Buschart A, Desai MS, Yusuf D, et al. The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. *Microbiologyopen.* 2015;4(2):252-66.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.235>
PMID:25611733 PMCID:PMC4398507
45. Koeppen K, Hampton TH, Jarek M, Scharfe M, Gerber SA, Mielcarz DW, et al. A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 2016;12(6):e1005672.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
PMID:27295279 PMCID:PMC4905634
46. Ho M-H, Chen C-H, Goodwin JS, Wang B-Y, Xie H. Functional advantages of *Porphyromonas gingivalis* vesicles. *PloS one.*

- 2015;10(4):e0123448.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123448>
 PMID:25897780 PMCID:PMC4405273
47. Sjöström AE, Sandblad L, Uhlin BE, Wai SN. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci Rep.* 2015;5:15329.
<https://doi.org/10.1038/srep15329>
 PMID:26483327 PMCID:PMC4612299
48. Aung KM, Sjöström AE, von Pawel-Rammingen U, Riesbeck K, Uhlin BE, Wai SN. Naturally occurring IgG antibodies provide innate protection against *Vibrio cholerae* bacteremia by recognition of the outer membrane protein U. *J Innate Immun.* 2016;8(3):269-83.
<https://doi.org/10.1159/000443646>
 PMID:26934383
49. Bielecka E, Scavenius C, Kantyka T, Jusko M, Mizgalska D, Szmigielski B, et al. Peptidyl arginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* abolishes anaphylatoxin C5a activity. *J Biol Chem.* 2014;289(47):32481-7.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C114.617142>
 PMID:25324545 PMCID:PMC4239603
50. Bottazzi B, Santini L, Savino S, Giuliani MM, Díez AID, Mancuso G, et al. Recognition of *Neisseria meningitidis* by the long pentraxin PTX3 and its role as an endogenous adjuvant. *PloS one.* 2015;10(3):e0120807.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120807>
 PMID:25786110 PMCID:PMC4364741
51. Laughlin RC, Mickum M, Rowin K, Adams LG, Alaniz RC. Altered host immune responses to membrane vesicles from *Salmonella* and Gram-negative pathogens. *Vaccine.* 2015;33(38):5012-9.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.014>
 PMID:26001432
52. Waller T, Kesper L, Hirschfeld J, Dommisch H, Kölpin J, Oldenburg J, et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles induce selective tumor necrosis factor tolerance in a toll-like receptor 4-and mTOR-dependent manner. *Infection and immunity.* 2016;84(4):1194-204.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01390-15>
 PMID:26857578 PMCID:PMC4807478
53. Shen Y, Torchia MLG, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell host & microbe.* 2012;12(4):509-20.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004>
 PMID:22999859 PMCID:PMC3895402
54. Lee HS, Boulton IC, Reddin K, Wong H, Halliwell D, Mandelboim O, et al. Neisserial outer membrane vesicles bind the coinhibitory receptor carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 and suppress CD4+ T lymphocyte function. *Infect Immun.* 2007;75(9):4449-55.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00222-07>
 PMID:17620353 PMCID:PMC1951172
55. Jones C, Sadarangani M, Lewis S, Payne I, Saleem M, Derrick JP, et al. Characterisation of the immunomodulatory effects of meningococcal Opa proteins on human peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cells. *PloS one.* 2016;11(4):e0154153.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154153>
 PMID:27111850 PMCID:PMC4844130
56. Winter J, Letley D, Rhead J, Atherton J, Robinson K. *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro-and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect Immun.* 2014;82(4):1372-81.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01443-13>
 PMID:24421041 PMCID:PMC3993389
57. Deknuydt F, Nordström T, Riesbeck K. Diversion of the host humoral response: a novel virulence mechanism of *Haemophilus influenzae* mediated via outer membrane vesicles. *J Leukoc Biol.* 2014;95(6):983-91.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1013527>
 PMID:24550522

58. Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS, editors. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in cell & developmental biology*. New York: Elsevier; 2015.
59. Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. Bacillus anthracis produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(44):19002-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107> PMID:20956325 PMCID:PMC2973860
60. Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, Martín-Pe-a R, González-Reyes JA, Jiménez-Munguía I, et al. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by Streptococcus pneumoniae. *J Proteomics*. 2014;106:46-60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.023> PMID:24769240
61. Hong SW, Kim MR, Lee EY, Kim J, Kim YS, Jeon S, et al. Extracellular vesicles derived from staphylococcus aureus induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy*. 2011;66(3):351-9. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02483.x> PMID:20831718 PMCID:PMC3052535
62. Hong SW, Choi E-B, Min T-K, Kim J-H, Kim M-H, Jeon SG, et al. An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus. *PLoS One*. 2014;9(7):e100499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100499> PMID:24992681 PMCID:PMC4084635
63. Kim MR, Hong SW, Choi EB, Lee WH, Kim YS, Jeon S, et al. Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses. *Allergy*. 2012;67(10):1271-81. <https://doi.org/10.1111/all.12001> PMID:22913540
64. Lee J, Lee E-Y, Kim S-H, Kim D-K, Park K-S, Kim KP, et al. Staphylococcus aureus extracellular vesicles carry biologically active β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2589-95. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12> PMID:23529736 PMCID:PMC3716153
65. Gurung M, Moon DC, Choi CW, Lee JH, Bae YC, Kim J, et al. Staphylococcus aureus produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS one*. 2011;6(11):e27958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027958> PMID:22114730 PMCID:PMC3218073
66. George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, et al. Mycolactone: a polyketide toxin from Mycobacterium ulcerans required for virulence. *Science*. 1999;283(5403):854-7. <https://doi.org/10.1126/science.283.5403.854> PMID:9933171
67. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of Mycobacterium ulcerans biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2007;3(5):e62. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030062> PMID:17480118 PMCID:PMC1864991
68. Prados-Rosales R, Baena A, Martinez LR, Luque-Garcia J, Kalscheuer R, Veeraraghavan U, et al. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1471-83. <https://doi.org/10.1172/JCI44261> PMID:21364279 PMCID:PMC3069770
69. Lee JH, Choi C-W, Lee T, Kim SI, Lee J-C, Shin J-H. Transcription factor σ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in Listeria monocytogenes. *PLoS one*. 2013;8(8):e73196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073196> PMID:23977379 PMCID:PMC3748028

70. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15611-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103> PMID:[17030793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030793/) PMCID:PMC1622870
71. Dobrogosz WJ, Peacock TJ, Hassan HM. Evolution of the probiotic concept: from conception to validation and acceptance in medical science. *Adv Appl Microbiol*. 2010;72:1-41. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)72001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)72001-3) PMID:[20602986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20602986/)
72. Kim Y-G, Ohta T, Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, Yokokura T, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- κ B and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes Infect*. 2006;8(4):994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.019> PMID:[16513392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16513392/)
73. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50959-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207050200> PMID:[12393915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393915/) PMCID:PMC4006994
74. Medellin-Pena MJ, Griffiths MW. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157: H7 colonization. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(4):1165-72. <https://doi.org/10.1128/AEM.01651-08> PMID:[19088323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088323/) PMCID:PMC2643578
75. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust*. 2007;186(9):454-6. PMID:[17484706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17484706/)
76. Castillo NA, Perdígón G, de LeBlanc AdM. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):177. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-177> PMID:[21813005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21813005/) PMCID:PMC3173335
77. Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2008;46(S2):S87-91. <https://doi.org/10.1086/523335> PMID:[18181730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18181730/)
78. Ng S, Hart A, Kamm M, Stagg A, Knight S. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(2):300-10. <https://doi.org/10.1002/ibd.20602> PMID:[18626975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18626975/)
79. Todorov SD. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Braz J Microbiol*. 2009;40(2):209-21. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200001> PMID:[24031346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24031346/) PMCID:PMC3769724
80. Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr*. 2007;137(3):781S-90S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.781S> PMID:[17311975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17311975/)
81. Ruiz L, Hevia A, Bernardo D, Margolles A, Sánchez B. Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;359(1):1-11. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12576> PMID:[25115731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25115731/)
82. van Bergenhenegouwen J, Kraneveld AD, Rutten L, Kettelarij N, Garssen J, Vos AP. Extracellular vesicles modulate host-microbe responses by altering TLR2 activity and phagocytosis. *PLoS One*. 2014 Feb 20;9(2):e89121.
83. Li M, Lee K, Hsu M, Nau G, Mylonakis E, Ramratnam B. *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):66. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0977-7> PMID:[28288575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28288575/) PMCID:PMC5348868

84. Kim J-H, Jeun E-J, Hong C-P, Kim S-H, Jang MS, Lee E-J, et al. Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(2):507-16. e8.
85. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(10):620-30.
86. Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host: parasite interactions. *PLoS pathogens*. 2013;9(7):e1003482.
87. Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, et al. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell*. 2016;164(1):246-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051> PMID:26771494 PMCID:PMC4715261
88. Mantel P-Y, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*. 2013;13(5):521-34. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009> PMID:23684304 PMCID:PMC3687518
89. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisqueira X, Coleman BM, Rug M, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell*. 2013;153(5):1120-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029> PMID:23683579
90. Raeven RH, Brummelman J, Pennings JL, Van Der Maas L, Tilstra W, Helm K, et al. *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine confers equal efficacy in mice with milder inflammatory responses compared to a whole-cell vaccine. *Sci Rep*. 2016;6:38240. <https://doi.org/10.1038/srep38240> PMID:27905535 PMCID:PMC5131296
91. Raeven RH, van der Maas L, Tilstra W, Uittenbogaard JP, Bindels TH, Kuipers B, et al. Immunoproteomic profiling of *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine reveals broad and balanced humoral immunogenicity. *J Proteome Res*. 2015;14(7):2929-42. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00258> PMID:25988566
92. Zariri A, Beskers J, van de Waterbeemd B, Hamstra HJ, Bindels TH, van Riet E, et al. Meningococcal outer membrane vesicle composition-dependent activation of the innate immune response. *Infect Immun*. 2016;84(10):3024-33. <https://doi.org/10.1128/IAI.00635-16>
93. Choi SJ, Kim MH, Jeon J, Kim OY, Choi Y, Seo J, et al. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity. *PloS one*. 2015;10(9):e0136021.
94. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*. 2011;29(34):5705-10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.001> PMID:21679737
95. Muralinath M, Kuehn MJ, Roland KL, Curtiss R. Immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2011;79(2):887-94. <https://doi.org/10.1128/IAI.00950-10> PMID:21115718 PMCID:PMC3028854
96. Schild S, Nelson EJ, Camilli A. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect Immun*. 2008;76(10):4554-63.

- <https://doi.org/10.1128/IAI.00532-08>
PMID:[18678672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18678672/) PMID:PMC2546833
97. Nakao R, Senpuku H, Watanabe H. Porphyromonas gingivalis galE is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation. *Infect Immun*. 2006;74(11):6145-53.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00261-06>
PMID:[16954395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16954395/) PMID:PMC1695533
98. Rappazzo CG, Watkins HC, Guarino CM, Chau A, Lopez JL, DeLisa MP, et al. Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice. *Vaccine*. 2016;34(10):1252-8.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.028>
PMID:[26827663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827663/)
99. Watkins HC, Rappazzo CG, Higgins JS, Sun X, Brock N, Chau A, et al. Safe recombinant outer membrane vesicles that display M2e elicit heterologous influenza protection. *Mol Ther*. 2017;25(4):989-1002.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.010>
PMID:[28215994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28215994/) PMID:PMC5383554
100. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Li K, et al. Employing Escherichia coli-derived outer membrane vesicles as an antigen delivery platform elicits protective immunity against Acinetobacter baumannii infection. *Sci Rep*. 2016;6:37242.
<https://doi.org/10.1038/srep37242>
PMID:[27849050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27849050/) PMID:PMC5110958
101. Petousis-Harris H, Paynter J, Morgan J, Saxton P, McArdle B, Goodyear-Smith F, et al. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *The Lancet*. 2017;390(10102):1603-10.
102. Zhang X, Yang F, Zou J, Wu W, Jing H, Gou Q, et al. Immunization with Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles stimulates protective immunity in mice. *Vaccine*. 2018;36(8):1047-54.
103. Chapman TJ, Georas SN. Adjuvant effect of diphtheria toxin after mucosal administration in both wild type and diphtheria toxin receptor engineered mouse strains. *J Immunol Methods*. 2013;400:122-6.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.10.010>
PMID:[24200744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24200744/) PMID:PMC3873768
104. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(5):488-96.
<https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x> PMID:[15479434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15479434/)
105. Siadat SD, Naddaf SR, Zangeneh M, Moshiri A, Sadat SM, Ardestani MS, et al. Outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as an adjuvant in immunization of rabbit against Neisseria meningitidis serogroup A. *Afr J Microbiol Res*. 2011;5(19):3090-5.
<https://doi.org/10.5897/AJMR11.361>
106. Salmani AS, Siadat SD, Norouzian D, Mobarakeh JI, Kheirandish M, Zangeneh M, et al. Outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the lipopolysaccharide of Brucella abortus S99. *Annals of microbiology*. 2009;59(1):145.
<https://doi.org/10.1007/BF03175612>
107. Gujrati VB, Jon S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles: what is their potential in cancer therapy? *Nanomedicine*. 2014;9(7):933-5.
<https://doi.org/10.2217/nmm.14.56>
PMID:[24978458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24978458/)
108. Kim OY, Park HT, Dinh NTH, Choi SJ, Lee J, Kim JH, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. *Nat Commun*. 2017;8(1):626.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
PMID:[28931823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28931823/) PMID:PMC5606984
109. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-89.

- <https://doi.org/10.3322/caac.21349>
PMID:27253694
110. Iyer AK, Singh A, Ganta S, Amiji MM. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(13):1784-802. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.012>
PMID:23880506
111. Gujrati V, Kim S, Kim S-H, Min JJ, Choy HE, Kim SC, et al. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano.* 2014;8(2):1525-37. <https://doi.org/10.1021/nn405724x>
PMID:24410085
112. Kim OY, Dinh NTH, Park HT, Choi SJ, Hong K, Gho YS. Bacterial protoplast-derived nanovesicles for tumor targeted delivery of chemotherapeutics. *Biomaterials.* 2017;113:68-79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.037> PMID:27810643
113. Alves NJ, Turner KB, Daniele MA, Oh E, Medintz IL, Walper SA. Bacterial nanobioreactors—directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(44):24963-72. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08811>
PMID:26479678
114. Kim JH, Yoon YJ, Lee J, Choi E-J, Yi N, Park K-S, et al. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules in vitro and in vivo. *PLoS one.* 2013;8(3):e59276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059276>
PMID:23516621 PMID:PMC3597602
115. Alves NJ, Turner KB, Medintz IL, Walper SA. Emerging therapeutic delivery capabilities and challenges utilizing enzyme/protein packaged bacterial vesicles. *Ther Deliv.* 2015;6(7):873-87. <https://doi.org/10.4155/tde.15.40>
PMID:26228777
116. Van Der Ley P, Steeghs L, Hamstra HJ, ten Hove J, Zomer B, van Alphen L. Modification of Lipid A Biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL Mutants: Influence on Lipopolysaccharide Structure, Toxicity, and Adjuvant Activity. *Infect Immun.* 2001;69(10):5981-90. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.5981-5990.2001> PMID:11553534
117. Wang L, Li F, Dang L, Liang C, Wang C, He B, et al. In vivo delivery systems for therapeutic genome editing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):626. <https://doi.org/10.3390/ijms17050626>
PMID:27128905 PMID:PMC4881452
118. Sheikhpour M, Barani L, Kasaeian A. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. *J Control Release.* 2017;253:97-109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.026>
PMID:28322976