

Bacterial extracellular vesicles in sepsis: from diagnosis to treatment

Elaheh Salmeh^{1,2}, Erfan Soroush^{1,2}, Masood Soltanipur^{1,3}, Hossein Yarmohammadi^{1,3}, Mahdi Rezaei^{1,4}, Leila Hafazeh⁵, Abolfazl Fateh¹, Seyed Mohsen Mirhosseini³, Seyed Davar Siadat¹

¹ Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

² Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Cardiovascular Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Health Research Center, Chamran Hospital, Tehran, Iran

⁵ Department of Physiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Sepsis is a systemic inflammatory reaction caused by infection. Severe sepsis can lead to multiple organ dysfunction, with high incidence and mortality. Nearly 500,000 cases of sepsis occur in the United States, causing 80,000 deaths annually. Septic shock is a subset of sepsis and is a fatal condition. Despite significant advances for treating this disorder, the mortality rate of sepsis remains high. Numerous studies have shown the important role of bacterial extracellular vesicles in cancers, neurodegenerative disorders, diabetes, viral infections, autoimmune and kidney diseases. Also, bacterial extracellular vesicles have recently received attention due to their effective help in the diagnosis and management of sepsis. In recent years, studies on the role of bacterial extracellular vesicles in inflammatory diseases have shown that they have a dual role in the imbalance of the inflammatory response in sepsis. Extracellular vesicles in sepsis can be beneficial or harmful, depending on their origin and content. These vesicles have also been considered mediators of cell death and inflammation during conditions such as sepsis. This review comprehensively reviews studies investigating the role of bacterial extracellular vesicles in the pathogenesis, management, and treatment of sepsis.

Keywords: *Bacterial extracellular vesicle, Sepsis, Inflammatory responses.*

Cited as: Salmeh E, Soroush E, Soltanipur M, Yarmohammadi H, Rezaei M, Hafazeh L, et al. Bacterial extracellular vesicles in sepsis: from diagnosis to treatment. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(3): 241-257.

Correspondence to: Seyed Davar Siadat

Tel: +98 9121442137

E-mail: d.siadat@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

Received: 9 Oct 2024; **Accepted:** 28 Dec 2024

وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی در سپسیس: از تشخیص تا درمان

الهه سال مه^{۱،۲}، عرفان سروش^{۱،۲}، مسعود سلطانی پور^{۱،۳}، حسین یار محمدی^{۱،۳}، مهدی رضایی^{۱،۴}، لیلا حفذه^۵، ابوالفضل فاتح^۱، سید محسن میرحسینی^۳، سید داور سیادت^۱

^۱ بخش سل و تحقیقات ریوی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۲ دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات سلامت، بیمارستان چمران، تهران، ایران

^۵ گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سپسیس نوعی واکنش التهابی سیستمیک ناشی از عفونت است. سپسیس شدید می‌تواند منجر به اختلال عملکرد ارگان‌های متعدد، با میزان بروز و مرگ و میر بالا شود. سالانه نزدیک به ۵۰۰ هزار مورد سپسیس در ایالات متحده آمریکا رخ می‌دهد که موجب مرگ ۸۰ هزار نفر در سال می‌شود. شوک سپتیک، زیر مجموعه سپسیس، یک وضعیت کشنده است. علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در درمان این بیماری، میزان مرگ و میر ناشی از سپسیس همچنان بالا است. تحقیقات متعدد نقش مهم وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی را در سرطان‌ها، اختلالات نورودژنراتیو، دیابت، عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های خود ایمنی نشان داده‌اند. هم‌چنین وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی اخیراً به دلیل کمک مؤثرشان در تشخیص و مدیریت سپسیس مورد توجه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر، با مطالعه نقش وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی در بیماری‌های التهابی، مشخص شده است که آن‌ها نقش دوگانه‌ای در عدم تعادل پاسخ التهابی در سپسیس دارند. وزیکول‌های خارج سلولی در سپسیس بسته به منشأ و محتویات آن‌ها می‌توانند همزمان مفید و مضر باشند. هم‌چنین این وزیکول‌ها به عنوان واسطه مرگ سلولی و التهاب در طی شرایطی مانند سپسیس مورد توجه قرار گرفته‌اند. این مطالعه مروری به هدف مرور گسترده مطالعات به بررسی نقش وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی در پاتوژنز، مدیریت و درمان سپسیس می‌پردازد.

واژگان کلیدی: وزیکول خارج سلولی باکتریایی، سپسیس، پاسخ‌های التهابی.

مقدمه

سپسیس (Sepsis) به عنوان "اختلال عملکرد ارگان تهدید کننده زندگی ناشی از پاسخ ناکارآمد میزبان به عفونت" تعریف می‌شود (۱). بنابراین سپسیس نوعی سندرم پاسخ التهابی سیستمیک (SIRS: Systemic inflammatory response syndrome) است که ممکن است در صورت عدم تشخیص و

درمان به موقع باعث شوک، نارسایی چند عضوی و حتی مرگ شود (۲،۳). شوک سپتیک (Septic shock) زیرمجموعه‌ای از سپسیس است که خطر مرگ بیشتری نسبت به سپسیس دارد. از مهم‌ترین علل مرگ و میر در شوک سپتیک می‌توان به ناهنجاری‌های مرتبط با گردش خون، سلول و متابولیک بسیار شدید اشاره کرد (۴). ایمنی ذاتی نقش اصلی را در سپسیس دارد. دو نوع عمده از مولکول‌هایی که باعث ایجاد سپسیس می‌شوند، شامل الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری‌زا (PAMPs: Pathogen-associated molecular pattern molecules) و الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMPs: Damage-associated molecular pattern molecules)

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، بخش سل و تحقیقات ریوی، سید داور سیادت (email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

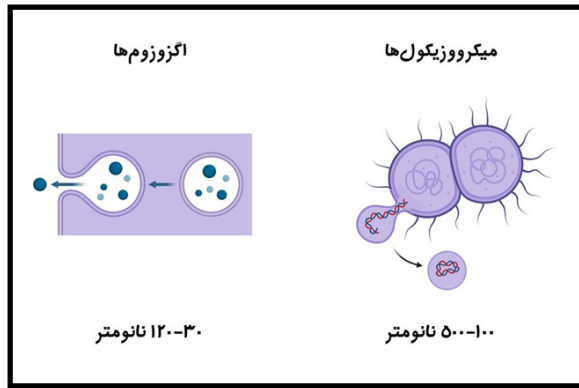
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۷/۱۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۸

هستند. یکی از PAMPs شناخته شده لیپوپلی ساکارید (LPS: Lipopolysaccharide) است که در دیواره سلولی خارجی باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شود. از طرف دیگر DAMPs مولکول‌هایی هستند که از سلول‌های در حال مرگ یا تحت استرس آزاد می‌شوند. PAMPs و DAMPs پس از اتصال به گیرنده‌های تشخیص الگو (PRRs: Pattern recognition receptors) باعث التهاب می‌شوند. فاکتورها و عوامل مختلفی در سپسیس مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما اخیراً بحث در مورد نقش وزیکول‌های خارج سلولی در پاتوژنز، مدیریت و درمان سپسیس شدت گرفته است (۵).

مطالعه وزیکول‌های خارج سلولی (EVs: Extracellular vesicles) دارای پتانسیل شناسایی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی ناشناخته در ارتباطات بین سلولی و هموستاز اندام و بیماری است (۶). به طور مثال در زمینه سرطان، این وزیکول‌ها می‌توانند به عنوان ابزارهایی موثر برای تشخیص و درمان به کار گرفته شوند. EVs به دلیل توانایی در حمل مولکول‌های زیستی همچون miRNA، پروتئین‌ها و لیپیدها، قادر به تغییر رفتار سلول‌های سرطانی و همچنین القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپتوزیس: Apoptosis) در این سلول‌ها هستند. علاوه بر این، EVs پتانسیل بالایی در انتقال داروهای ضد سرطان به بافت‌های هدف دارند و به عنوان حامل‌هایی موثر در درمان سرطان شناخته شده‌اند (۷). EVs از لحاظ ساختار، وزیکول‌های محصور در دو لایه لیپیدی هستند و توسط سلول‌های مختلف پستانداران تحت شرایط فیزیولوژیکی و بیماری‌های مختلف ترشح می‌شوند (۸). ثابت شده است که EVs ترشح شده از انواع مختلف سلول، نقش‌های مشخص و ویژه‌ای در سپسیس دارند. EVs ارتباطات بین سلولی را هماهنگ می‌کنند و در نتیجه واسطه‌ای برای فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک هستند (۹). EVs را می‌توان با توجه به بیوژنز و اندازه آنها به سه زیر گروه اصلی تقسیم کرد که شامل اگزوزوم‌ها (Exosomes: Exos)، میکرووزیکول‌ها (Microvesicles: mvs) و اجسام آپتوتیک (ApoBDs: Apoptotic bodies) می‌شود (۱۰). با توجه به میزبانی که EVs از آن مشتق شده‌است، این مولکول‌ها نام‌های متفاوتی دارند، مانند وزیکول‌های غشای خارجی باکتری (OMVs: Outer membrane vesicles) برای میکروارگانیسم‌های گرم منفی، MVs (Membrane vesicles) برای میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و میکرووزیکول‌ها یا Exos برای سلول‌های پستانداران (۱۱). از میان این موارد، اخیراً تحقیقات در مورد OMVs و MVs افزایش یافته است.

سلول‌های باکتریایی به آزادسازی EVs معروف هستند و آزاد شده توسط باکتری‌های بیماری‌زا (bEVs: Bacterial extracellular vesicles) زمانی تشکیل می‌شوند که باکتری‌های گرم منفی از غشای بیرونی خود به بیرون جوانه می‌زنند. بیوژنز آن‌ها شبیه به EVs سلول‌های انسانی است، اما تفاوت‌های ساختاری و عملکردی بین OMVs و MVs وجود دارد. OMVs در باکتری‌های گرم منفی از غشای خارجی مشتق می‌شوند و شامل مولکول‌های LPS هستند که نقش مهمی در فعالسازی پاسخ‌های ایمنی دارند. در مقابل، MVs از طریق مکانیسم‌های دیگری مانند بازآرایی دیواره سلولی آزاد می‌شوند و محتوای پروتئینی و پپتیدوگلیکان بیشتری دارند (۱۲). OMVs که از پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) آزاد می‌شوند، بیش از ۵۰ سال است که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۳). تولید OMVs برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ میلادی در یک سویه اشریشیا کلی اکسوتروف (Auxotroph) مشاهده شد که مقادیر قابل توجهی LPS بدون سلول را تحت شرایط رشد محدودکننده لیزین آزاد می‌کرد (۱۴). bEVs دارای اجزای بیماری‌زای مختلفی از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و فاکتورهای حدت هستند. به طور خاص، ماهیت کوچک bEVs آن‌ها را قادر می‌سازد تا از سدهای خونی مغزی و جفتی عبور کنند که معمولاً عبور پاتوژن‌ها از آن‌ها دشوار است (۱۵). اگزوزوم‌ها ساختارهای کروی شکل با اندازه‌های بین ۳۰ تا ۱۲۰ نانومتر هستند و در مقایسه با سیستم‌های دیگر، مانند MVs، که محدوده اندازه آن بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر است، بسیار کوچکتر هستند (شکل ۱) (۱۶). OMVs عموماً از نظر اندازه شبیه اگزوزوم‌های یوکاریوتی و میکرووزیکول‌های کوچکتر هستند و بین ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر اندازه دارند و به عنوان یک مکانیسم ترشح و انتقال برای سلول‌های باکتریایی عمل می‌کنند (۱۷، ۱۸). در ابتدا تصور می‌شد که ارگانیسم‌های اصلی که باعث سپسیس باکتریایی می‌شوند، باکتری‌های گرم منفی هستند. با این حال، در ۲۵ سال گذشته نشان داده شده است که باکتری‌های گرم مثبت شایع‌ترین علت سپسیس هستند (۱۹). باکتری‌های دخیل در سپسیس عبارتند از: استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، استرپتوکوکوس پایوژنز (*Streptococcus pyogenes*)، گونه‌های کلبسیلا (*Klebsiella spp.*)، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) (۲۰). OMVs حاصل از باکتری‌های گرم منفی عوامل بیماری‌زای مختلفی مانند LPS، لیپوپروتئین‌ها و مواد



شکل ۱. اندازه و نحوه آزاد شدن اگزوزوم‌ها و میکرووزیکول‌ها

پاتوفیزیولوژی سپسیس

عدم تعادل پاسخ التهابی شایع‌ترین پاتوژن سپسیس است و تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند که EVs نقش‌های دوگانه پیش‌التهابی و ضدالتهابی، در طول پاسخ التهابی به سپسیس دارند (۲۷). پاتوفیزیولوژی پیچیده سپسیس به ۲ مرحله تقسیم شده است که اولین مرحله فاز پر التهابی (Hyperinflammatory phase) است که به دنبال آن یک فاز سرکوب کننده سیستم ایمنی (Immunosuppressive phase) رخ می‌دهد و در نهایت منجر به اختلال عملکرد و یا نارسایی اندام می‌شود (۳۰-۲۸). هنگامی که عفونت رخ می‌دهد، PAMPs توسط سلول‌های ایمنی ذاتی از طریق PRRs شناسایی می‌شوند. PRRs شامل TLRs (Tool-like receptors)، NLRs (Nucleotide oligomerization domain-like receptors)، CLR (C-type lectin receptors) و RIG-I (like receptors) هستند (۳۲، ۳۱). برای شروع پاسخ ایمنی میزبان در سپسیس از طریق تشخیص پاتوژن، شناخت PAMPs، DAMPs و فعال سازی سیستم کمپلمان (که به عنوان یک تقویت کننده پاسخ التهابی در طول سپسیس شناخته شده است) ضروری هستند (۳۳). در بیماران مبتلا به سپسیس سطوح سایتوکین‌های سرمی افزایش می‌یابند که برای شروع "طوفان سایتوکاین" مهم هستند. در مرحله اولیه سپسیس، سایتوکاین‌های پیش التهابی به نام اینترلوکین‌ها (IL: interleukins) مانند IL-1 β ، IL-2، IL-6، IL-15، IL-17، IL-12، و هم چنین اینترفرون گاما (IFN- γ): Interferon gamma و فاکتور نکروز تومور الفا (TNF α): Tumor necrosis factor alpha شروع به افزایش می‌کنند. در حالی که سایتوکاین‌های ضد التهابی مانند IL-4 و IL-10 در مراحل بعدی در بیماران سبتیک افزایش می‌یابند (۳۴، ۳۰).

ژنتیکی را در سراسر سیستم میزبان منتشر می‌کنند. OMVs با تغییر پاسخ ایمنی میزبان، توانایی القای اثرات پاتوفیزیولوژیک در تعامل بین باکتری‌ها و میزبان خود را دارند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که OMVs می‌توانند پاسخ التهابی سپسیس مانند را تشدید کنند و باعث فعال شدن کاردیومیوسیت‌ها شوند که منجر به اختلال عملکرد قلبی مرتبط با سپسیس می‌شود (۲۱). OMVs باکتریایی از طریق چندین مکانیسم مختلف، مانند فعال کردن سلول‌های ایمنی میزبان از طریق TLRs (به عنوان مثال، TLR4)، رساندن محتوای باکتری به سلول‌های میزبان و تحریک انتشار سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی، با سلول‌های میزبان تعامل می‌کنند. OMVs پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را در سپسیس از طریق مسیرهای متعدد فعال می‌کنند. آلانیز و همکارانش دریافتند که OMVs سالمونلا تیفی موریوم (*Salmonella Typhimurium*) به طور قوی ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را فعال می‌کنند، و بیان CD86، MHC-II و تولید واسطه‌های پیش التهابی را افزایش می‌دهند (۲۲). هم چنین OMVs باکتریایی می‌توانند سلول‌های پستانداران میزبان را وادار کنند تا وزیکول‌های خارج سلولی تحریک کننده را آزاد کنند که پاسخ‌های التهابی را افزایش می‌دهد (۲۳).

به طور کلی، EVs دارای مزایایی مانند سمیت کم، ایمنی زایی کم و پایداری بیشتر در گردش خون هستند. بنابراین، به عنوان یک انتخاب مناسب برای سلول درمانی در نظر گرفته می‌شوند. ثابت شده است که EVs نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سپسیس، تومورهای بدخیم، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های خود ایمنی دارند (۲۴). ارتباط بین EVs و سپسیس در سال ۱۹۹۸ میلادی در یک مدل خوک اندوتوکسمی نشان داده شد. از آن زمان، تعداد مطالعاتی که EVs را به عنوان نشانگر و واسطه‌های سپسیس توصیف می‌کنند، به طور پیوسته افزایش یافت (۲۵). به طور کلی، EVs چشم‌اندازهای کاربردی بسیار خوبی در سپسیس دارند که می‌توان به نقش آن‌ها در تشخیص زودهنگام سپسیس، مدیریت پویای بیماری، اهداف درمانی دقیق، و پیشگیری از سپسیس به عنوان یک پلت فرم واکسن اشاره کرد (۲۶).

به همین منظور در این مطالعه مروری با توجه به اهمیت بسیار بالای OMVs در سپسیس به بررسی و بحث در این مورد می‌پردازیم که ممکن است تعامل این دو در شناخت بهتر پاتوژن سپسیس و همچنین در تشخیص و درمان این اختلال تاثیر گذار باشد.

در سپسیس فعالیت بیش از حد پاسخ‌های التهابی در برابر تهدید پاتوژن‌ها را شاهد هستیم که می‌تواند باعث فعالیت غیرطبیعی سیستم کمپلمان، سیستم انعقادی و اختلال عملکرد اندوتلیال عروقی شود (۳۵). مکمل‌های C3a و C5a دارای اثرات پیش‌التهابی قوی هستند. از جمله این اثرات شامل جذب و فعال‌سازی لکوسیت‌ها و پلاکت‌ها است که به سطح سلول‌های اندوتلیال می‌چسبند و از طریق پاسخ التهابی بیش از حد منجر به اختلال در عملکرد آن می‌شوند (۳۶). علاوه بر این، التهاب بیش از حد باعث آسیب سلولی و آزادسازی PAMPs شده که منجر به فعال شدن بیشتر سیستم ایمنی ذاتی و شیوع التهاب می‌شود و در نهایت آسیب و اختلال عملکرد اندام‌ها را خواهیم داشت.

وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی در

پاتوژن سپسیس

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به عنوان شایع‌ترین عوامل عفونی در سپسیس، می‌توانند EVs حامل اندوتوکسین‌های باکتریایی و انتقال‌دهنده پروتئین‌های باکتریایی را تولید کنند که وارد جریان گردش مایعات بیمار سپتیک می‌شود (۳۷). در طول عفونت باکتریایی گرم منفی، OMVs به عنوان تسهیل‌کننده‌های حیاتی برای ورود LPS و فعال‌سازی کاسپاز-۱۱ به سیتوپلاسم عمل می‌کنند (۳۸). OMVs و MVs دارای آنتی‌ژن‌های خاص وابسته به TLR2 یا TLR4 هستند، باعث فعال شدن سلول‌های B و سلول‌های T می‌شوند که منجر به فعال شدن ایمنی اکتسابی می‌شود (۳۹،۴۰). لکوسیت‌ها و سایر سلول‌های غیر ایمنی دارای PRRs مانند TLRs هستند. این گیرنده‌ها می‌توانند PAMPs و سایر EVs پاتوژن را شناسایی کرده و به آن‌ها متصل شوند. این تعامل متعاقباً آبشارهای سیگنال دهی سلولی را آغاز می‌کند. همزمان، از طریق مسیرهای مختلف، از جمله آبشار سیگنالینگ NF- κ B، پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی در سپسیس فعال می‌شوند و در نتیجه التهاب سیستمیک را القا می‌کنند (۴۱).

بنابراین همان‌طور که اشاره شد bEVs در پاتوژن بیماری‌های التهابی نقش مهمی دارند و هر دو EVs باکتری‌های گرم مثبت و منفی در ایجاد التهاب می‌توانند نقش داشته باشند که مقایسه نحوه بیماری‌زایی و تفاوت‌های ساختاری و عوامل حدت آنها به صورت جامع مورد بررسی قرار می‌گیرد (۴۲). bEVs زمانی تشکیل می‌شوند که باکتری‌های گرم منفی از

غشای بیرونی خود به بیرون جوانه می‌زنند و در نتیجه OMVs را ایجاد می‌کنند، یا از غشای باکتری‌های گرم مثبت آزاد می‌شود که به آن MVs گفته می‌شود. این OMVs کروی با اندازه نانو از غشای سلول بیرونی آزاد می‌شوند و از LPS، پپتیدوگلیکان (PG: Peptidoglycan)، پروتئین‌ها، DNA، RNA و سایر عوامل بیماری‌زا مانند آنزیم‌ها و سموم تشکیل شده‌اند (شکل ۲). در حالی که MVs به جای LPS، لیپوپروتئین دارند (۴۳-۴۵). دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی شامل غشای خارجی، غشای سیتوپلاسمی (داخلی) و فضای پری پلاسمیک در بین آن است که حاوی لایه‌ای از PG است (۴۶). غشای خارجی از یک برگچه بیرونی LPS (Exterior leaflet) (O-آنتی ژن، هسته و لیپید A) و یک برگچه داخلی از فسفولیپیدها تشکیل شده است، غشای سیتوپلاسمی داخلی از دولایه فسفولیپیدی تشکیل شده است که به عنوان یک مانع الکتروشیمیایی عمل می‌کند. پری پلاسم یک محیط اکسیداتیو است که فولدینگ پروتئین را افزایش می‌دهد اما حاوی منابع انرژی نوکلئوتیدی مانند ATP یا GTP نیست (۴۷). همچنین LPS به عنوان اندوتوکسین باکتریایی شناخته می‌شود و جزء اصلی لیپیدی در غشاء بیرونی OMVs است و تصور می‌شود که در القای التهاب مربوط به سپسیس گرم منفی نقش اصلی را دارد (۴۸). OMVs شبیه میکرووزیکول‌های یوکاریوتی هستند زیرا از انقباض غشای بیرونی ناشی می‌شوند. سلول‌های گرم مثبت با دیواره سلولی ضخیم در ابتدا تصور نمی‌شد که قادر به آزادسازی EVs باشند، اما تعداد زیادی از مطالعات وجود آن‌ها را نشان داده‌اند. EVs گرم مثبت و EVs قارچی مشابه از غشای داخلی جوانه می‌زنند و باید قبل از رها شدن از داخل دیواره سلولی (که به عنوان لایه پپتیدوگلیکان نیز شناخته می‌شود) حرکت کنند. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که تضعیف لایه پپتیدوگلیکان ممکن است باعث آزادسازی EV شود (۴۹). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که OMVs در بیماری‌های التهابی مختلف، از جمله بیماری پریدونتال، التهاب گوارشی، التهاب ریوی و سپسیس، با تحریک گیرنده‌های تشخیص الگو، فعال کردن التهاب و القای اختلال عملکرد میتوکندری نقش دارند (۵۰).

چندین فرضیه غالب وجود دارد که هدف آن‌ها روشن کردن مکانیسم‌های نهفته در انتشار EVs توسط باکتری‌های گرم مثبت از طریق دیواره سلولی است. سه مکانیسم اصلی وجود دارد که ممکن است به انتشار این EVs کمک کند. در مکانیسم اول، تجمع EVs می‌تواند منجر به افزایش فشار بر

روی دیواره سلولی شود و در نتیجه EVs از طریق غشای پلازما آزاد می‌شوند. در مکانیسم دوم، وجود آنزیم‌های اصلاح کننده دیواره سلولی می‌تواند باعث تخریب دیواره سلولی شود و آزادسازی bEVs را تسهیل کند. در مکانیسم سوم، فرض بر این است که تغییر شکل bEVs به طور بالقوه می‌تواند عبور آن‌ها را از طریق منافذی که دارای عرض باریک‌تر از قطر اندازه گیری شده bEVs هستند، تسهیل کند (۵۱، ۵۲).

OMVs در مجموعه‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی، از جمله ارتباطات درون سلولی و خارج سلولی، انتقال افقی ژن، کشتن بین باکتریایی، انتقال سم، هیدرولیز پلی ساکارید و پاسخ‌های استرس نقش دارند (۵۳). هم‌چنین به عنوان یک مکانیسم موثر برای ارتباط مستقیم بین باکتری‌ها و سلول‌های میزبان در القای تغییرات پاتولوژیک میزبان و پاتوژن‌هایی که از ایمنی میزبان فرار می‌کنند نقش دارند (۲۶). این به bEVs اجازه می‌دهد تا عوامل بیماری‌زا را به سلول‌های میزبان معرفی کنند، سیستم ایمنی میزبان را تحریک کنند و پیشرفت عفونت‌های باکتریایی و سپسیس را تسریع کنند. bEVs با تحریک مستقیم تولید مولکول‌های عامل ایمنی مانند ROS (Reactive oxygen species) یا به طور غیرمستقیم با افزایش سنتز سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، پاسخ ایمنی ذاتی را تحریک می‌کنند (۵۴). دانشمندان نشان داده‌اند که OMVs قادر به شروع پاسخ التهابی هستند که در انتقال عفونت به سپسیس مشاهده می‌شود، نقش پیچیده‌ای در فعال‌سازی اندوتلیال دارند و می‌توانند باعث آسیب قلبی شوند که می‌تواند علائم بیمار را بدتر کند (۴۱، ۵۵). تحریک سلول‌های اندوتلیال توسط OMVs باعث ترشح سایتوکاین، بیان پروتئین چسبندگی و ارائه مولکول‌های چسبندگی E-selectin و P-selectin می‌شود که مهاجرت سلول‌های التهابی به محل عفونت را تسهیل می‌کند (۵۶). علاوه بر تعامل با سلول‌های اپیتلیال میزبان، OMVs آزاد شده از باکتری می‌توانند به طور مستقیم بر جمعیت‌های مختلف سلول‌های ایمنی، از جمله نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک (Dendritic cells: DCs) تأثیر بگذارند (۱۲). OMVs باکتریایی باعث التهاب و آبشارهای انعقادی در سپسیس می‌شوند. مطالعات نشان داده اند که OMVs در پاسخ بیش از حد انعقاد در سپسیس نقش دارند که منجر به انعقاد درون رگی منتشر (DIC: Disseminated intravascular coagulation) مربوط به سپسیس می‌شود (۵۷).

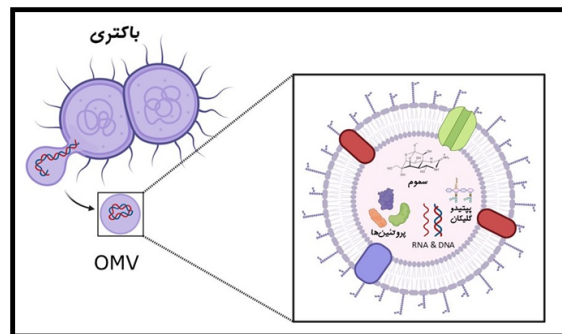
تاکنون مطالعات زیادی در مورد نحوه اثر OMVs بر سیستم ایمنی میزبان و اهمیت این وزیکول‌ها در ایجاد شوک سپتیک

و هم‌چنین القای سپسیس در حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است. از سوی دیگر با وجود نقش MVs در ایجاد سپسیس و شیوع بالاتر آن‌ها در ایجاد این بیماری‌های خلاهای زیادی در شناخت نقش پاتولوژیک این وزیکول‌ها وجود دارد (۵۸). مشاهدات مبنی بر اینکه EVs می‌توانند باعث ایجاد سپسیس شوند از مطالعات تجربی سرچشمه می‌گیرند. القاننده‌های کلاسیک سپسیس تجربی شامل تزریق LPS (داخل رگی (IV) Intravenous) یا داخل صفاقی (IP) (Intraperitoneal) یا بستن و سوراخ کردن سکوم (Cecal ligation and puncture: CLP) هستند. اخیراً، یک مدل سپسیس جدید مبتنی بر تزریق نوع خاصی از EVs یعنی OMVs در مقالات در چند سال گذشته توصیف شده است (۵۹). در حال حاضر، مشخص شده است که OMVs هم‌چنین MVs می‌توانند شرایط پاتولوژیک را در داخل بدن ایجاد کنند. به عنوان مثال، سپسیس ایجاد شده توسط OMVs واسطه‌ی التهاب و آبشارهای انعقادی در مدل‌های حیوانی است (۶۰، ۶۱). OMVs اشیریشیا کلی تزریق شده از طریق ورید گردنی (Jugular) باعث ایجاد تغییرات بافتی، فیزیولوژیکی و مولکولی در موش‌های صحرایی شد که شبیه علائم سپسیس بالینی بود. OMVs اشیریشیا کلی با تزریق داخل صفاقی نیز پاسخ التهابی سیستمیک میزبان را القا کرد. این نتیجه مشابه علائم بالینی مربوط به سپسیس است که با هیپوترمی (Hypothermia)، تاکی پنه (Tachypnoea)، لکوپنی (Leukopenia)، اختلال در عملکرد ریه‌ها، DIC و افزایش IL-6 و TNF- α مشخص می‌شود. علاوه بر این، OMVs محرک‌های قوی‌تر سپسیس با کشندگی بالاتری نسبت به تزریق LPS به تنهایی هستند. نقش اجزای OMVs در سپسیس هنوز ناشناخته است. هم‌چنین تحقیقات گذشته به OMVs اشیریشیا کلی بیماری‌زا محدود بود، در حالی که مطالعات بعدی نشان داد که هر دو نوع بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا اشیریشیا کلی می‌توانند آبشارهای التهابی را در سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان آغاز کنند (۶۱). علاوه بر این، سایر محموله‌های OMVs به غیر از LPS ممکن است در پاتوژن کشندگی مرتبط با سپسیس مهم باشند. بنابراین OMVs از طریق مسیرهای متعدد در بروز و پیشرفت بیماری سپسیس نقش دارند (۴۰، ۶۲). از سوی دیگر کیم و همکارانش در مطالعه‌ای دریافتند که MVs استافیلوکوکوس اورئوس التهاب ریوی نوتروفیل Th1 و Th17 را القا می‌کند و حساسیت بیش از حد راه هوایی به آلرژن‌های استنشاقی را تسهیل می‌کند. هم‌چنین حضور MVs استافیلوکوکوس

است برای تسهیل تشخیص پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده شوند. با این حال، CRP و PCT ویژگی پایینی برای تشخیص سپسیس در مراحل پیشرفته بیماری دارند و شاخص قابل اعتمادی برای پیش‌آگهی و التهاب سیستمیک نیستند (۶۵). شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا در انسان گاهی اوقات به دلایل مختلفی مانند عفونت‌های موضعی یا درمان‌های همزمان با آنتی‌بیوتیک‌های تهاجمی و همچنین باکتری‌های کند رشد و حساسیت ضعیف روش‌های تشخیصی، دشوار است (۵۸). تجزیه و تحلیل بیش از ۲/۵ میلیون مورد سپسیس با استفاده از پایگاه داده مراقبت‌های بهداشتی برتر در ایالات متحده آمریکا نشان داد که عامل ارگانسمی خاصی که مسئول سپسیس است در بیش از ۷۰ درصد موارد قابل شناسایی نیست (۶۶). در مطالعه دیگری توسط استرانی‌ری و همکارانش، عامل ارگانسمی سپسیس نوزادان را تنها در ۴۱ درصد از کشت‌های خون بیماران شناسایی کرد (۶۷). در واقع، باکتری‌ها در محیط‌های کشت نزدیک به ۲۴ ساعت زمان نیاز دارند تا رشد کنند و بنابراین با تشخیص سریع و درمان آنتی‌بیوتیکی اختصاصی مناسب که در ۱ تا ۳ ساعت پس از تشخیص انواع عفونت (مانند سپسیس) پیشنهاد می‌شود، سازگار نیستند (۳). در حالی که کشت باکتریایی نمی‌تواند یک روش دقیق و سریع برای شناسایی باکتری‌های عامل عفونت ارائه دهند، OMVs می‌توانند یک رویکرد تشخیصی قطعی‌تر را امکان‌پذیر کنند (۶۸،۶۹).

تا به امروز، نشانگرهای زیستی مرسوم برای تشخیص سپسیس شامل CRP، PCT و ال-لاکتات بوده‌اند. علاوه بر این، نشانگرهای زیستی جدیدی مانند پروتئین متصل‌کننده هپارین (Heparin binding protein)، پرسپسین (Presepsin) و iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۷). EVs با منشأ سلولی مختلف، مانند لکوسیت‌ها، ماکروفاژها، پلاکت‌ها و گرانولوسیت‌ها، به عنوان بیومارکرهای سپسیس پیشنهاد شده‌اند. آنها تشخیص سپسیس را زودتر از نشانگرهای التهاب بالینی کلاسیک مانند CRP، PCT، تعداد لکوسیت‌ها یا IL-6 امکان‌پذیر می‌کنند (۲۵). نشانگرهای زیستی نوظهور سپسیس شامل پرسپسین، sTREM-1 (Soluble triggering)، پروآدرنومدولین (receptor expressed on myeloid cell-1)، پروآدرنومدولین (Proadrenomedullin)، ترانسکریپتومیکس (Transcriptomics)، پروتئومیکس (Proteomics) و متابولومیکس (Metabolomics) هستند (۷۰).

اورئوس را در گرد و غبار خانه مشاهده کردند و نقش آنها را به عنوان عوامل مهم بیماری‌های التهابی ریوی نشان دادند (۶۰). سایر باکتری‌های گرم مثبت، از جمله باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*)، استرپتومایسس کولی کالر (*Streptomyces coelicolor*)، لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*)، کلسترییدیوم پرفرجنس (*Clostridium perfringens*) و استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) نیز MVs تولید می‌کنند. با این حال، نقش پاتولوژیک احتمالی آنها در داخل بدن بررسی نشده است. واضح است که MVs همچنین می‌توانند به طور قابل توجهی در فرآیندهای بیماری در طول عفونت باکتریایی نقش داشته باشند (۶۳).



شکل ۲. محتویات OMV آزاد شده از باکتری‌های گرم منفی

OMVs به عنوان ابزار تشخیص در

سپسیس

تشخیص زود هنگام سپسیس در محیط بالینی بسیار مهم است زیرا می‌تواند به بهبود قابل توجه بیماران کمک کند. در چند سال گذشته، EVs به عنوان نشانگرهای مفید اولیه و پایدار سپسیس مورد توجه قرار گرفتند. در بیماران شوک سپتیک، میکروذرات مشتق از لکوسیت و پلاکت در بیماران که به حمایت عروقی طولانی‌تر و تهویه مکانیکی نیاز داشتند به طور قابل توجهی افزایش یافت (۶۴). تشخیص مرسوم سپسیس شامل کشت میکروبیولوژی خون یا ادرار برای شناسایی نشانگرهای سپسیس است. کشت‌های میکروبیولوژیکی اطلاعات مفیدی را ارائه می‌دهند. با این حال، به علت طولانی بودن زمان انکوباسیون (Incubation)، این تست‌ها برای تشخیص سریع مناسب نیستند. عوامل رایج و نشانگرهای زیستی مانند پروتئین واکنش‌دهنده سی (CRP: reactive -C protein) و پروکلسی‌تونین (PCT: Procalcitonin) ممکن

زمان تشخیص سپسیس بیمار اغلب پیش‌بینی کننده پیامد بالینی آنها است و بر نیاز به یک تست تشخیصی مولکولی قطعی‌تر تاکید می‌کند. تا کنون مطالعات زیادی در مورد EVs مشتق از میزبان و نقش آن‌ها در تشخیص سپسیس در مراحل اولیه صورت گرفته است به طوری که این وزیکول‌ها شاخص‌های مفیدی برای تشخیص التهاب در بیماران هستند. از سوی دیگر bEVs به دلیل داشتن نشانگرهای باکتریایی خاص، برای تشخیص عفونت‌های مرتبط با سپسیس کابردی تر هستند. مزایا و چالش‌های استفاده از OMVs، به عنوان یک نشانگر زیستی تشخیصی برای سپسیس گرم منفی نکات جالبی را مورد توجه قرار می‌دهد (۲۴).

با توجه به اندازه OMVs، آنها می‌توانند به طور گسترده در بدن گردش کنند و آزادانه از موانع بافتی عبور کنند که تشخیص کارآمد از طریق مایعات بیولوژیکی مانند ادرار یا خون را امکان پذیر می‌کند (۵۸). برخلاف EVs مشتق شده از میزبان، استفاده از bEVs مشتق شده از مایعات بیولوژیک به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. با این وجود، شواهد بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد تغییرات در میکروبیوم مرتبط با بیماری‌ها به طور موثری می‌تواند در سطوح و ترکیب bEVs مشتق شده از مایعات بیولوژیک مشاهده شود. بنابراین، وجود bEVs مشتق شده از مایعات بیولوژیک، مانند آن‌هایی که در سرم یافت می‌شوند، ممکن است با وضعیت عفونت خاصی مرتبط باشد. این باعث می‌شود bEVs به عنوان نشانگرهای زیستی برای تشخیص سریع التهاب و تشخیص بیماری، گزینه‌ای امیدوارکننده در تشخیص بالینی باشد (۷۱). در دهه گذشته، با افزایش درک ما از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک پشت سپسیس، شناسایی بیومارکرهای محتمل برای تشخیص نیز افزایش یافته است. با این حال، هنوز هیچ نشانگر زیستی تشخیصی قطعی برای سپسیس وجود ندارد و امروزه تنها تعداد انگشت شماری از بیومارکرها معمولاً در بیمارستان‌ها استفاده می‌شوند (۷۲)–(۷۴).

سه مزیت اصلی استفاده از OMVs به عنوان نشانگرهای زیستی برای سپسیس گرم منفی شامل موارد زیر است: (۱) توانایی آن‌ها در القای التهاب میزبان و نقش احتمالی آنها در سپسیس باکتریایی، (۲) محتوای آنتی‌ژنی مشتق از والدین که محتوای آنتی‌ژنی خاص می‌تواند با شرایط محیطی تغییر کند و (۳) مقاومت آنها در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها (۵۸). به عنوان مثال، LPS می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای باکتری‌های گرم منفی عمل کند، در حالی که اوره آز آ (Urease A) و پروتئین شوک حرارتی ۶۰ (Heat shock

(HSP60) (proteins 60) برای هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) می‌تواند به عنوان بیومارکر استفاده شود (۷۵). تصور می‌شود حتی سطوح بسیار پایین OMVs ممکن است قابل تشخیص باشد و امکان شناسایی منبع باکتریایی را فراهم کند، اگرچه ممکن است تکنیک‌های تشخیص حساس‌تری مانند روش‌های مبتنی بر PCR مورد نیاز باشد. در حالی که اسیدهای نوکلئیک اگزوزن از باکتری به سرعت توسط نوکلئازهای میزبان تجزیه می‌شود، DNA یا RNA موجود در OMVs ممکن است به طور نامحدود از تخریب محافظت شود. جداسازی و خالص‌سازی مؤثر bEVs از مایعات بیولوژیکی پیچیده همچنان یک چالش محسوب می‌شود و حل آن راهبردهای تشخیصی مختلفی را ممکن می‌سازد که درک محققان را از پیشرفت سپسیس و درمان بیماران بهبود می‌بخشد (۵۸). برای شناسایی OMVs در یک سیال زیستی پیچیده مانند پلاسما، باید تیترا OMVs در هنگام عفونت و حساسیت دستگاه تشخیص را در نظر گرفت. تیتراهای پایین OMVs و یا حساسیت کم دستگاه تشخیص (به عنوان مثال، اتصال آنتی بادی ضعیف به هدف آنتی ژنی OMVs) می‌تواند منجر به سیگنال مثبت ضعیف و تیترا بالای EVs خارجی یا انتخاب ضعیف دستگاه تشخیص به عنوان مثال اتصال آنتی بادی غیرانتخابی به اهداف غیر OMVs شود که می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب شود. بنابراین، یک مرحله خالص‌سازی و یا غلظت اولیه OMVs می‌تواند حساسیت و گزینش پذیری را بهبود بخشد. اگرچه خالص‌سازی EVs انسانی و باکتریایی از سیالات زیستی پیچیده مانند سرم و ادرار از نظر فنی بسیار سخت است. این مایعات علاوه بر سلول‌های کامل و قطعات سلولی، حاوی انواع مختلفی از پروتئین‌ها، کمپلکس‌های لیپیدی، RNA و DNA خارج سلولی و همچنین سایر نانوذرات بیولوژیکی با چگالی و همپوشانی در اندازه هستند (۷۶). به دلیل عدم شناسایی bEVs، آن‌ها به خوبی از EVs یوکاریوتی مشتق از میزبان متمایز نمی‌شوند. به علت محدوده اندازه همپوشانی (۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر) bEVs و EVs یوکاریوتی مشتق از میزبان، استفاده از bEVs را به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی محدود می‌کند. انتظار می‌رود استفاده از bEVs به عنوان یک نشانگر تشخیصی در آینده به پیشرفت خود ادامه دهد. مسیر آینده آن نه تنها این پتانسیل را دارد که مکانیسم‌های تشخیصی فعلی را متحول کند، بلکه بینش‌هایی را در مورد رابطه بین bEVs و شرایط پاتولوژیک نیز ارائه می‌دهد (۷۷). برای تشخیص bEVs از EVs یوکاریوتی، معمولاً از نواحی فوق

متغیر 16S rRNA V3-V4 ریبوزومی استفاده می‌شود. این مناطق به منظور تعیین کمیت، شناسایی و طبقه بندی باکتری‌ها در نمونه‌های پیچیده استفاده می‌شوند (۷۷). مطالعات متعددی جداسازی bEVs در گردش از سرم را نشان داده‌اند. ارزیابی تنوع و کمیت ترکیبات باکتریایی در EVs موجود در مایعات بیولوژیکی با استفاده از توالی یابی نسل بعدی نواحی فوق متغیر V3-V4 در تجزیه و تحلیل متاژنومی 16S rRNA انجام شده است (۷۸)، (۷۹). در مطالعه انجام شده توسط لی و همکاران، EVs مشتق شده از نمونه‌های ادرار برای انجام توالی 16S rRNA مورد استفاده قرار گرفتند (۸۰). روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی و جداسازی EVs، از سانتریفیوژ تا فناوری‌های میکروسیال جدید استفاده شده است. دو تکنیک در ابتدا برای خالص‌سازی EVs نسبتاً رایج شدند، اولتراسانتریفیوژ (UC: Ultracentrifugation) و رسوب پلیمری. با این حال، چندین مطالعه نشان داده‌اند که روش‌های رسوب‌گذاری منجر به رسوب قابل توجهی از پروتئین‌های آلوده، کمپلکس‌های لیپوپروتئین و RNA خارج سلولی می‌شود که در نتیجه بسیاری از محققان این روش را متوقف کردند (۸۱، ۸۲). از سوی دیگر، UC به عنوان یک استاندارد طلایی برای خالص‌سازی EVs مطرح شده است. اگرچه تکنیک‌های جدیدتر، خلوص و بازیابی بالاتری را ارائه می‌کنند (۸۳، ۸۴).

همانطور که گفته شد OMVs با وجود اینکه بیومارکرهای دقیقی برای تشخیص سپسیس هستند با محدودیت‌هایی همچون نیاز به روش‌های جداسازی دقیق از مایعات بیولوژیکی مواجه هستند که استفاده از آن‌ها را محدود می‌کند. این نشانگرهای زیستی، می‌توانند ارزیابی غیر تهاجمی و سریعی را از سپسیس و چگونگی پیشرفت آن نمایش دهند. همچنین فرصتی امیدوارکننده را برای طبقه‌بندی بیماران بر اساس شدت بیماری و حساسیت به درمان فراهم کنند (۸۵).

وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی به

عنوان یک ابزار درمانی در سپسیس

استراتژی‌های فعلی درمان سپسیس شامل درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، مدیریت ونتیلاتور، نگهداری قند خون، استراتژی‌های احیا و درمان‌های حمایتی است (۸۶، ۸۷). با این حال، عفونت‌های پایدار مسئول ۷۰ تا ۸۰ درصد مرگ و میرهای سپسیس هستند که به مقاومت گسترده ضد میکروبی و فقدان انتخاب‌های درمانی موثر نسبت داده می‌شود (۸۸).

EVs دارای بسیاری از ویژگی‌های مطلوب از جمله پایداری، زیست سازگاری، نفوذ سد بیولوژیکی و سمیت کم هستند که آن‌ها را به ابزاری جذاب برای درمان تبدیل می‌کند (۸۹).

bEVs به عنوان یک هدف کانونی در پاتوفیزیولوژی و درمان سپسیس در حال ظهور هستند. bEVs با داشتن اندازه‌ای کوچک می‌توانند از سدهای خونی مغزی و جفتی که عبور پاتوژن‌ها دشوار است عبور کنند، عوامل بیماری‌زا را به سلول‌های میزبان برسانند، سیستم ایمنی میزبان را فعال کنند و احتمالاً روند عفونت باکتریایی و سپسیس بعدی را تسریع کنند. در طول سال‌ها، تحقیقات در مورد EVs مشتق از میزبان افزایش یافته است که منجر به پیشرفت‌هایی در درمان سرطان و سپسیس شده است. با این حال، رویکردهای مرتبط با نقش و استفاده از bEVs هنوز در درمان سپسیس نادر است (۹۰). EVs درمانی معمولاً به عنوان EVs بومی (Native EVs) و EVs مهندسی شده (Engineered EVs) طبقه بندی می‌شوند که هر دو گروه در درمان شوک سپتیک استفاده می‌شوند. EVs بومی که در حال حاضر برای درمان‌های درون تنی (in vivo) استفاده می‌شوند، EVs مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells: MSCs)، EVs مشتق شده از سلول‌های دندریتیک (DCs) و EVs مشتق شده از پلاسما هستند که ممکن است در درمان شوک سپتیک مفید باشند (۹۱). در مجموع، bEVs به عنوان یک ابزار درمانی نوین در درمان سپسیس پتانسیل فراوانی دارند. با توجه به نقش مهم این وزیکول‌ها در تنظیم پاسخ ایمنی و اثرات ضد التهابی آن‌ها، استفاده از آنها می‌تواند به عنوان یک روش درمانی موثر در کاهش شدت و پیشگیری از پیشرفت سپسیس مطرح شود. با این حال، نیاز به تحقیقات بیشتر و آزمایش‌های بالینی برای تایید اثرات و ایمنی این درمان‌ها در انسان‌ها ضروری است.

۱. OMVs به عنوان فعال کننده‌های سیستم ایمنی

همانطور که در پاتوژنز بیماری سپسیس بیان شد یکی از کاتالیزورهای اولیه برای فعال سازی سیستم ایمنی در رابطه با bEVs آزادسازی سایتوکاین‌های پیش التهابی است. از این رو، مهار فعالیت ایمنی تحریک شده توسط bEVs به عنوان یک مسیر درمانی قابل قبول برای سپسیس ظاهر می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده اند که TAK-242، یک مهارکننده فعالیت ناشی از bEV، توانایی هدف قرار دادن TLR4 و کاهش فعالیت IL-1b و TNF ناشی از وزیکول‌های خارج سلولی اشیریشیا کلی را دارد (۹۲).

هم‌چنین در سال‌های اخیر، محققان ساختار و ترکیب bEVs را تقلید کرده‌اند و نانوذرات مختلف حاوی داروی تقلید کننده EVs را برای درمان و پیشگیری از سپسیس طراحی کرده‌اند. پارک و همکاران، نانوذرات یکول‌هایی با شباهت زیاد به bEVs را سنتز کردند و تحقیقاتی را در مورد اثربخشی درمانی این نانوذرات یکول‌ها در درمان التهاب مرتبط با سپسیس انجام دادند (۹۳).

بنابراین، مکانیسم‌های مرتبط با bEVs می‌توانند به صورت استراتژیک به عنوان اهداف درمانی در سپسیس مورد استفاده قرار گیرند. بدین صورت که از طریق دستکاری استراتژیک تولید bEVs، مکانیسم‌های فعال‌سازی ایمنی bEVs و با برهم زدن یکپارچگی bEVs، می‌توان کنترل دقیقی بر نقش تعدیل‌کننده ایمنی آن‌ها اعمال کرد و پاسخ التهابی بیش از حد را کاهش داد و در نتیجه از سپسیس جلوگیری کرد. هدف قرار دادن تولید bEVs و یا فعالیت آن‌ها ممکن است یک رویکرد درمانی امیدوارکننده برای درمان عفونت‌ها و شرایط مرتبط با آن مانند سپسیس باشد (۹۴، ۹۵).

هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد، تجویز GW4869 که یک مهارکننده خنثی اسفنگومیلیناز است مانع تولید EVs شده و افزایش قابل توجهی در میزان بقای موش‌هایی که در معرض تزریق LPS یا CLP قرار گرفتند، نشان داد. این یافته حاکی از آن است که تولید bEVs تأثیر قابل توجهی در ایجاد سپسیس دارد و مهار آن اثرات آن‌ها را کاهش می‌دهد (۹۶).

بر اساس یافته‌های بدست آمده، عملکردهای تعدیل‌کننده ایمنی مرتبط با bEVs که می‌تواند منجر به سپسیس و سایر شرایط التهابی شود، می‌تواند با هدف قرار دادن مسیرهای مختلف بیوژنز، مکانیسم‌های تنظیم‌کننده ایمنی و یکپارچگی ساختاری bEVs از طریق پیشرفت در بازدارنده‌های جدید bEVs جلوگیری شود. همچنین، آزمایش‌های بالینی باید برای تأیید اثربخشی و سمیت چنین مهارکننده‌هایی به عنوان گزینه‌های درمانی برای پیشگیری و درمان سپسیس مورد استفاده قرار گیرند.

۲. OMVs به عنوان حامل دارو

از آنجایی که OMVs به راحتی توسط آنزیم‌های مختلف تجزیه نمی‌شوند، می‌توانند به بافت‌های هدف خاص خود برسند. در عین حال، به دلیل شناسایی و جذب سریع آن‌ها توسط سلول‌های میزبان، OMVs به طور گسترده به عنوان سیستم‌های تحویل برای انتقال مواد برای اهداف مختلف زیست پزشکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. OMVs مشتق شده طبیعی می‌توانند به عنوان حامل DNA، RNA، آنتی ژن

و آنتی بادی یا به عنوان وسیله ناقل تحویل محموله‌های طبیعی خود عمل کنند (۹۷). bEVs ظرفیت انتقال انواع مختلفی از داروها را دارند که شامل داروهای رادیوتراپی، داروهای شیمی درمانی با مولکول‌های کوچک و داروهایی با پیامدهای تشخیصی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۹۸). تغییرات OMVs را می‌توان با بارگذاری محموله‌های مورد نظر در داخل لومن OMVs، با قرار دادن نانوذرات یا با پنهان کردن OMVs در داخل نانوذرات، یا با جاسازی اجزای مورد نظر (مانند آنتی ژن، آنتی بادی، لیگاند و غیره) در داخل لایه غشای بیرونی اعمال کرد (۹۹).

در حال حاضر، چندین تکنیک برای بارگذاری مواد مختلف در OMVs، از جمله مهندسی ژنتیک، الکتروپوراسیون (Electroporation)، انکوباسیون، همجوشی غشایی و اصلاح شیمیایی به کار گرفته شده است که به بررسی هریک از آنها می‌پردازیم.

مهندسی ژنتیک متداول‌ترین روشی است که برای وارد کردن پروتئین‌های مورد نظر به سطوح بیرونی یا داخلی OMVs از طریق تبدیل پلاسمیدها به باکتری‌های مادر استفاده می‌شود (۱۰۰).

یکی از این تکنیک‌ها الکتروپوراسیون است که شامل استفاده از پالس‌های ولتاژ بالا برای ایجاد منافذ در غشای OMVs است که منجر به یک حالت نفوذپذیر موقت می‌شود (۱۰۳-۱۰۱). این نفوذپذیری موقت امکان بارگیری داروها، پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها، نانوذرات با اندازه کوچک (مانند نانوذرات طلای فلزی) و غیره را فراهم می‌کند که با استفاده از پالس‌های الکتریکی مختلف در مدت زمان‌های مختلف قابل دستیابی است. پس از بارگذاری مولکول‌های مورد نظر، غشای OMVs می‌تواند ساختار اولیه خود را بازیابی کند و نفوذپذیری موقت را بدون هیچ آسیبی از دست بدهد. به طور مشابه، تیمار OMVs با معرف‌های حاوی ساپونین، نفوذپذیری غشاء آن‌ها را افزایش می‌دهد که بارگیری محموله را بدون آسیب رساندن به ساختار غشاء تسهیل می‌کند (۱۰۵، ۱۰۴). یک مطالعه نشان داده است که سرکوب مسیرهای بیوژنز به طور موثری مانع از تولید bEVs می‌شود، که منجر به کاهش قابل توجه در تحویل اجزای مضر آن‌ها و کاهش سپسیس می‌شود. بر این اساس ترکیبات مختلفی با هدف جلوگیری از تولید bEV معرفی شده است (۱۰۶).

OMVs شبیه باکتری‌های والدین خود هستند و توانایی مهار چسبندگی باکتری‌های بیماری‌زا والدین خود را به سلول میزبان با اتصال رقابتی به همان محل هدف دارند (۱۰۸، ۱۰۷).

عفونت‌های باکتریایی با چسبندگی سلول‌های باکتریایی به سلول مورد نظر آغاز می‌شوند و بنابراین، درمان ضد چسبندگی می‌تواند در مقایسه با سایر درمان‌های مرسوم که ممکن است مقاومت آنتی‌بیوتیکی را القاء کنند، درمان امیدوارکننده‌ای را ارائه دهد. علاوه بر این، ترکیب درمان‌های آنتی‌بیوتیکی و ضد چسبندگی اثربخشی ضد باکتریایی مشترک را نشان می‌دهد (۱۰۹). در سال‌های اخیر، گزارش‌های متعددی استفاده از OMVs را به‌عنوان حامل آنتی‌بیوتیک یا به‌عنوان عوامل ضدباکتری فعال بررسی کرده‌اند (۱۱۰، ۱۱۱). OMVs همچنین می‌توانند به عنوان طعمه برای مقابله و کاهش فعالیت آنتی‌بیوتیک عمل کنند. OMVs ناشی از اشریشیا کلی در محافظت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های هدفمند غشایی نقش دارند. این اثر محافظتی به باکتری اشریشیا کلی محدود نمی‌شود، زیرا OMVs خالص شده باکتری اشریشیا کلی اثر محافظتی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر رادیورزیستنت (*Acinetobacter radioresistens*) در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند. با این حال، اثر محافظتی OMVs را نمی‌توان به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند سیپروفلوکساسین، استرپتومایسین و تری متوپریم تعمیم داد، در نتیجه به نظر می‌رسد OMVs عمدتاً در برابر آنتی‌بیوتیک‌هایی که غشا را هدف قرار می‌دهند محافظت می‌کنند (۱۱۲).

اولین مشاهده از اثر باکتری کشی OMVs در سال ۱۹۹۶ میلادی گزارش شد، زمانی که OMVs حاصل از سودوموناس آئروژینوزا حاوی پپتیدوگلیکان هیدرولاز (اتولیزین) بودند (۱۱۳). در این گزارش مشخص شد که OMVs حاصل از سودوموناس آئروژینوزا فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*Staphylococcus epidermidis*) به دلیل وجود کینولین‌ها در OMVs دارند. این راستا، آنتاگونیست بین باکتریایی بین حداقل دو باکتری را می‌توان به منظور استفاده از OMVs آن‌ها به عنوان عوامل ضد باکتری بررسی کرد (۱۱۴). علاوه بر فعالیت ضد باکتریایی طبیعی، OMVs به دلیل ظرفیت هدف‌گیری کارآمد، بارگیری دارو، محافظت از محموله، زمان گردش طولانی مدت و غیره می‌توانند به عنوان حامل آنتی‌بیوتیک نیز استفاده شوند (۱۱۵، ۱۱۶). گزارش شده است که ظرفیت هدف‌گیری، خواص فارماکوکینتیک و پایداری شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان با بارگیری در داخل OMVs افزایش داد (۱۱۱).

۳. واکسن‌های مبتنی بر OMVs

OMVs به طور طبیعی در تعدادی از فرآیندها از جمله تشکیل بیوفیلم، ترشح پروتئین حدت و ارتباط سلولی به

سلول عمل می‌کنند (۱۸). یکی از مزایای OMVs اندازه آنها است که امکان ورود آن‌ها به عروق لنفاوی و جذب توسط سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن (APCs) را فراهم می‌کند (۱۱۷). علاوه بر این، OMVs دارای خواص کمکی (adjuvant) طبیعی هستند که به شدت پاسخ‌های ایمنی ذاتی و مهم‌تر از آن اکتسابی را تحریک می‌کنند. پایداری بالای OMVs پس از قرار گرفتن در معرض دماهای بالا و چندین پروسه شیمیایی، آن‌ها را به عنوان کاندیدای واکسن نشان می‌دهد (۱۱۸). پس OMVs کاندیدای عالی واکسن علیه باکتری‌های بیماری‌زا هستند و می‌توانند به عنوان آنتی ژن برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی (سایتوکاین‌ها و سلول‌های T فعال) و هومورال (آنتی بادی) در انسان و حیوانات استفاده شوند (۱۱۹). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که واکسن‌های مشتق شده از OMVs می‌توانند مصونیت محافظتی در برابر عفونت‌های باکتری‌های بیماری‌زا مانند نایسریا مننژیتیدیس (*Neisseria meningitidis*)، اسینتوباکتر بومانی (*Acinetobacter baumannii*)، پورفیروموناس جینجیوالیس (*Porphyromonas gingivalis*)، سالمونلا تیفی موربوم، هلیکوباکتر پیلوری و ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*) را در مدل‌های حیوانی ایجاد کنند (۱۲۰-۱۱۸). واکسن‌های ساخته شده از bEVs، البته نه به طور گسترده، برای محافظت در برابر سپسیس در مدل‌های مختلف موش به کار گرفته شده‌اند. کیم و همکاران نشان داده‌اند که ایمن سازی با EVs از اشریشیا کلی باعث ایجاد اثرات واکسیناسیون قوی علیه سپسیس باکتریایی می‌شود. تجویز این OMVs تولید شده از اشریشیا کلی به طور موثر از ایجاد سندرم پاسخ التهابی سیستمیک ناشی از OMVs جلوگیری کرد. مکانیسم حفاظتی OMVs عمدتاً با فعال‌سازی ایمنی سلول T (فعال‌سازی پاسخ‌های سلول Th1 و Th17) به جای ایمنی سلول B انجام می‌شود. به طور خاص، تولید IFN- γ و IL-17 از سلول‌های T، در پاسخ به تحریک آنتی ژن OMVs، نقش مهمی در ایجاد محافظت ایفا کرد. مطالعه دیگری ارزیابی کرد که آیا واکسن‌های EVs حاصل از کلبسیلا نومونیا (*Klebsiella pneumoniae*) دارای اثرات محافظتی در برابر سپسیس ناشی از باکتری هستند یا خیر. در مدل موشی، واکسن جدید از کشندگی ناشی از باکتری جلوگیری کرد و در برابر سپسیس ناشی از باکتری محافظت کرد (۱۲۲، ۱۲۱). تا کنون تحقیقات بسیاری در مورد bEVs در بیماری‌های متعدد مانند سرطان‌ها، IBD و هم‌چنین سپسیس صورت گرفته است (۱۲۳). استفاده از این وزیکول‌ها با قابلیت چندانگانه آنها در تحریک ایمنی، دارورسانی و پیشگیری از

سپسیس سبب می‌شود که OMVs ابزارهای امیدوارکننده‌ای در درمان سپسیس به شمار آیند.

نتیجه‌گیری

وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی به عنوان ابزارهای زیست‌پزشکی نوین با ویژگی‌هایی چون سازگاری زیستی بالا و خطر بدخیمی کمتر نسبت به خود باکتری‌ها، پتانسیل فراوانی در درمان بیماری‌هایی مانند سپسیس دارند. ساختار پیچیده مولکول‌های فعال زیستی در این وزیکول‌ها، همراه با قابلیت عبور آنها از موانع سلولی و رسیدن به بافت‌های مختلف بدن، استفاده از آنها را در انواع مصارف بالینی و درمانی به ویژه در بیماری‌های التهابی بسیار جذاب می‌سازد. بر اساس مطالعات متعدد، نقش دوگانه وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی در اختلال در پاسخ‌های التهابی سپسیس مشخص شده است. وزیکول‌های باکتری‌های گرم منفی از آن جهت که حاوی مولکول‌هایی چون LPS هستند، می‌توانند به‌عنوان عوامل تشدیدکننده التهاب عمل کنند و منجر به آسیب بافتی و مرگ سلولی شوند. در عین حال، برخی از وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی می‌توانند با تنظیم دقیق سیستم ایمنی و به‌عنوان نشانگرهای زیستی زودهنگام، به تشخیص و درمان سپسیس کمک کنند.

با وجود این پتانسیل‌ها، چالش‌های بزرگی در زمینه استفاده بالینی گسترده از وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی وجود

دارد. فقدان درک کامل از مکانیسم‌های سیستمیک و نحوه تولید این وزیکول‌ها در بیماری سپسیس، محدودیت‌هایی را در کاربرد آنها ایجاد کرده است. توانایی آنها در تشدید التهاب، همراه با وجود مقادیر بالای اندوتوکسین‌ها و عوامل حدت در برخی از وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی، باعث می‌شود که استفاده از آنها در درمان‌های بالینی همچنان محدود باشد. به‌علاوه، این مسأله که نقش و اثرات این وزیکول‌ها در بیماری‌های التهابی هنوز به‌طور کامل روشن نشده است، نیازمند تحقیقات بیشتر و تجزیه و تحلیل‌های دقیق‌تری است. در این راستا، پژوهش‌های آتی باید به شفاف‌سازی مکانیسم‌های مولکولی و سیستمیک وزیکول‌های خارج سلولی باکتریایی، ترکیبات خاص آنها و رابطه دقیق‌شان با پاسخ‌های ایمنی و التهابی بپردازند. این تحقیقات می‌توانند به درک بهتری از کاربردهای درمانی این وزیکول‌ها در بیماری‌هایی نظیر سپسیس منجر شوند و به توسعه درمان‌های نوین و مؤثر در این زمینه کمک کنند. به‌طور خاص، شناخت بهتر اهداف درمانی احتمالی و مکانیسم‌های التهابی مرتبط با این وزیکول‌ها می‌تواند مسیر را برای طراحی و اجرای طرح‌های درمانی موفق‌تر هموار کند. در نهایت، این پیشرفت‌ها نه تنها می‌توانند کمک شایانی به بهبود درمان سپسیس و دیگر بیماری‌های التهابی کنند، بلکه در نهایت به ارتقاء کیفیت زندگی بیماران و کاهش مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری‌ها کمک خواهند کرد.

REFERENCES

- Huang M, Cai S, Su J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 2019;20: 5366.
- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:259–72.
- Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021;47:1181–247.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801–10.
- Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 2019; 10:2536.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020;367: eaau6977.
- Wang L, Yu X, Zhou J, Su C. Extracellular Vesicles for Drug Delivery in Cancer Treatment. *Biol Proced Online* 2023;25:28.
- Murao A, Brenner M, Aziz M, Wang P. Exosomes in Sepsis. *Front Immunol* 2020; 11:2140.
- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 2015;65:783–97.
- van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23:369–82.

11. Jalalifar S, Morovati Khamisi H, Hosseini-Fard SR, Karampoor S, Bajelan B, Irajian G, et al. Emerging role of microbiota derived outer membrane vesicles to preventive, therapeutic and diagnostic proposes. *Infect Agents Cancer* 2023;18:3.
12. Yu YJ, Wang XH, Fan GC. Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:514–33.
13. McMillan HM, Kuehn MJ. The extracellular vesicle generation paradox: a bacterial point of view. *EMBO J* 2021;40:e108174.
14. Bishop DG, Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *Biochem J* 1965;96:567–76.
15. Qin YF, Lu XY, Shi Z, Huang QS, Wang X, Ren B, et al. Deep Learning-Enabled Raman Spectroscopic Identification of Pathogen-Derived Extracellular Vesicles and the Biogenesis Process. *Anal Chem* 2022;94:12416–26.
16. Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:940–8.
17. Guerrero-Mandujano A, Hernández-Cortez C, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* 2017;18:425–32.
18. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:605–19.
19. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546–54.
20. Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, Maki DG, Freebairn RC, Kinasewitz GT, et al. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis* 2003;37:50–8.
21. Kakehana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care* 2016; 4:22.
22. Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol* 2007;179:7692–701.
23. Imamiya R, Shinohara A, Yakura D, Yamaguchi T, Ueda K, Oguro A, et al. *Escherichia coli*-Derived Outer Membrane Vesicles Relay Inflammatory Responses to Macrophage-Derived Exosomes. *mBio* 2023;14: e0305122.
24. Raeven P, Zipperle J, Drechsler S. Extracellular Vesicles as Markers and Mediators in Sepsis. *Theranostics* 2018;8:3348–65.
25. Weber B, Henrich D, Hildebrand F, Marzi I, Leppik L. The roles of extracellular vesicles in sepsis and systemic inflammatory response syndrome Shock 2023;59:161–72.
26. Tian C, Wang K, Zhao M, Cong S, Di X, Li R. Extracellular vesicles participate in the pathogenesis of sepsis. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 1018692.
27. Jin X, Sun H, Yang L. How Extracellular Nano-Vesicles Can Play a Role in Sepsis? An Evidence-Based Review of the Literature. *Int J Nanomedicine* 2023; 18:5797–814.
28. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Pallardó F V, Ferreres J, Rodríguez M, Mulet S, et al. Sepsis and Coronavirus Disease 2019: Common Features and Anti-Inflammatory Therapeutic Approaches. *Crit Care Med* 2020;48:1841–4.
29. Cao C, Yu M, Chai Y. Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death Dis* 2019;10:782.
30. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol* 2017;39:517–28.
31. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–20.
32. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16–34.
33. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med* 2019; 7:2050312119835043.
34. Gao K, Jin J, Huang C, Li J, Luo H, Li L, et al. Exosomes Derived from Septic Mouse Serum Modulate Immune Responses via Exosome-Associated Cytokines. *Front Immunol* 2019; 10:1560.

35. van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017;17:407–20.
36. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* 2015; 6:257.
37. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007;369:2196–210.
38. Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* 2016 May;165(5):1106–19.
39. 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.
40. Shah B, Sullivan CJ, Lonergan NE, Stanley S, Soult MC, Britt LD. Circulating bacterial membrane vesicles cause sepsis in rats. *Shock* 2012;37:621–8.
41. Soult MC, Lonergan NE, Shah B, Kim WK, Britt LD, Sullivan CJ. Outer membrane vesicles from pathogenic bacteria initiate an inflammatory response in human endothelial cells. *J Surg Res* 2013;184:458–66.
42. Sun D, Chen P, Xi Y, Sheng J. From trash to treasure: the role of bacterial extracellular vesicles in gut health and disease. *Front Immunol* 2023; 14:1274295.
43. Jung AL, Schmeck B, Wiegand M, Bedenbender K, Benedikter BJ. The clinical role of host and bacterial-derived extracellular vesicles in pneumonia. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;176:113851.
44. González MF, Díaz P, Sandoval-Bórquez A, Herrera D, Quest AFG. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles and Extracellular Vesicles from *Helicobacter pylori*-Infected Cells in Gastric Disease Development. *Int J Mol Sci* 2021;22:4823.
45. Furuyama N, Sircili MP. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: Structure, Functions, Biogenesis, and Vaccine Application. *Biomed Res Int* 2021; 2021:1490732.
46. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2: a000414.
47. Kojer K, Riemer J. Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochim Biophys Acta* 2014;1844:1383–90.
48. Cavaillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* 2018; 149:45–53.
49. Bose S, Aggarwal S, Singh DV, Acharya N. Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microb Cell* 2020;7:312–22.
50. Chen S, Lei Q, Zou X, Ma D. The role and mechanisms of gram-negative bacterial outer membrane vesicles in inflammatory diseases. *Front Immunol* 2023; 14:1157813.
51. 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;13:620–30.
52. Briaud P, Carroll RK. Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infect Immun* 2020;88: e00333-20).
53. Sartorio MG, Pardue EJ, Feldman MF, Haurat MF. Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annu Rev Microbiol* 2021;75:609–30.
54. Effah CY, Drokow EK, Agboyibor C, Ding L, He S, Liu S, et al. Neutrophil-Dependent Immunity During Pulmonary Infections and Inflammations. *Front Immunol* 2021; 12:689866.
55. Svennerholm K, Park KS, Wikström J, Lässer C, Crescitelli R, Shelke G V, et al. *Escherichia coli* outer membrane vesicles can contribute to sepsis induced cardiac dysfunction. *Sci Rep* 2017;7:17434.
56. Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, Sorasaki M, Parikh SM, Jones AE, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010;14: R182.
57. Wang Y, Zhang S, Luo L, Norström E, Braun OÖ, Mörgelin M, et al. Platelet-derived microparticles regulates thrombin generation via phosphatidylserine in abdominal sepsis. *J Cell Physiol* 2018;233:1051–60.
58. Michel LV, Gaborski T. Outer membrane vesicles as molecular biomarkers for Gram-negative sepsis: Taking advantage of nature's perfect packages. *J Biol Chem* 2022;298:102483.

59. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol* 2017; 8:1053.
60. Kim MR, Hong SW, Choi EB, Lee WH, Kim YS, Jeon SG, et al. Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses. *Allergy* 2012;67:1271–81.
61. Sault MC, Dobrydneya Y, Wahab KH, Britt LD, Sullivan CJ. Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators. *J Surg Res* 2014;192:134–42.
62. Park KS, Choi KH, Kim YS, Hong BS, Kim OY, Kim JH, et al. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome. *PloS One* 2010;5: e11334.
63. Kim JH, Lee J, Park J, Gho YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40:97–104.
64. Boscolo A, Campello E, Bertini D, Spiezia L, Lucchetta V, Piasentini E, et al. Levels of circulating microparticles in septic shock and sepsis-related complications: a case-control study. *Minerva Anesthesiol* 2019;85:625–34.
65. Claxton A, Papafilippou L, Hadjidemetriou M, Kostarelos K, Dark P. The challenge of recognising sepsis: Future nanotechnology solutions. *J Intensive Care Soc* 2020;21:241–6.
66. Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med* 2018;46:1889–97.
67. Stranieri I, Kanunfre KA, Rodrigues JC, Yamamoto L, Nadaf MIV, Palmeira P, et al. Assessment and comparison of bacterial load levels determined by quantitative amplifications in blood culture-positive and negative neonatal sepsis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2018;60: e61.
68. Pilecky M, Schildberger A, Knabl L, Orth-Höller D, Weber V. Influence of antibiotic treatment on the detection of *S. aureus* in whole blood following pathogen enrichment. *BMC Microbiol* 2019;19:180.
69. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, Stabler SN, Akhter M, Davidson AC, et al. Blood Culture Results Before and After Antimicrobial Administration in Patients with Severe Manifestations of Sepsis: A Diagnostic Study. *Ann Intern Med* 2019;171:547–54.
70. Turgman O, Schinkel M, Wiersinga W. Host Response Biomarkers for Sepsis in the Emergency Room. *Crit Care* 2023 Mar 21; 27:97.
71. Tulkens J, Vergauwen G, Van Deun J, Geurickx E, Dhondt B, Lippens L, et al. Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut* 2020;69:191–3.
72. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care* 2010;14: R15.
73. Grondman I, Pirvu A, Riza A, Ioana M, Netea MG. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans* 2020;48:1–14.
74. Opal SM, Wittebole X. Biomarkers of Infection and Sepsis. *Crit Care Clin* 2020;36:11–22.
75. Singh V, Mishra S, Rao GRK, Jain AK, Dixit VK, Gulati AK, et al. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter* 2008;13:30–4.
76. Brennan K, Martin K, FitzGerald S, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep* 2020; 10:1039.
77. Kang CS, Ban M, Choi EJ, Moon HG, Jeon JS, Kim DK, et al. Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PloS One* 2013;8: e76520.
78. Park JY, Kang CS, Seo HC, Shin JC, Kym SM, Park YS, et al. Bacteria-Derived Extracellular Vesicles in Urine as a Novel Biomarker for Gastric Cancer: Integration of Liquid Biopsy and Metagenome Analysis. *Cancers (Basel)* 2021;13: 4687.
79. Yang J, Moon HE, Park HW, McDowell A, Shin TS, Jee YK, et al. Brain tumor diagnostic model and dietary effect based on extracellular vesicle microbiome data in serum. *Exp Mol Med* 2020;52:1602–13.
80. Lee Y, Park JY, Lee EH, Yang J, Jeong BR, Kim YK, et al. Rapid Assessment of Microbiota Changes in Individuals with Autism Spectrum Disorder Using Bacteria-derived Membrane Vesicles in Urine. *Exp Neurobiol* 2017;26:307–17.

81. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 2015; 87:3–10.
82. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DGJ. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep* 2016; 6:23978.
83. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A* 2021; 1636:461773.
84. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.
85. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles-based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015; 4:30087.
86. Alhazzani W, Möller MH, Arabi YM, Loeb M, Gong MN, Fan E, et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med* 2020; 46:854–87.
87. Sartelli M, Kluger Y, Ansaloni L, Hardcastle TC, Rello J, Watkins RR, et al. Raising concerns about the Sepsis-3 definitions. *World journal of emergency surgery: World J Emerg Surg* 2018; 13:6.
88. Popescu CR, Cavanagh MMM, Tembo B, Chiume M, Lufesi N, Goldfarb DM, et al. Neonatal sepsis in low-income countries: epidemiology, diagnosis and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2020; 18:443–52.
89. van den Boorn JG, Schlee M, Coch C, Hartmann G. SiRNA delivery with exosome nanoparticles. *Front Immunol* 2011; 29:325–6.
90. Effah CY, Ding X, Drokow EK, Li X, Tong R, Sun T. Bacteria-derived extracellular vesicles: endogenous roles, therapeutic potentials and their biomimetics for the treatment and prevention of sepsis. *Front Immunol* 2024; 15:1296061.
91. Cao M, Shi M, Zhou B, Jiang H. An overview of the mechanisms and potential roles of extracellular vesicles in septic shock. *Front Immunol* 2023; 14:1324253.
92. Pfalzgraff A, Correa W, Heinbockel L, Schromm AB, Lübow C, Gisch N, et al. LPS-neutralizing peptides reduce outer membrane vesicle-induced inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2019; 1864:1503–13.
93. Park KS, Svennerholm K, Shelke G V, Bandeira E, Lässer C, Jang SC, et al. Mesenchymal stromal cell-derived nanovesicles ameliorate bacterial outer membrane vesicle-induced sepsis via IL-10. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10:231.
94. Seyama M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Ono K, Eguchi T, et al. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* attenuate insulin sensitivity by delivering gingipains to the liver. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; 1866:165731.
95. David L, Taieb F, Pénary M, Bordinon PJ, Planès R, Bagayoko S, et al. Outer membrane vesicles produced by pathogenic strains of *Escherichia coli* block autophagic flux and exacerbate inflammasome activation. *Autophagy* 2022; 18:2913–25.
96. Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:2362–71.
97. Jiang Y, Zhou Z, Liu C, Wang L, Li C. Bacterial outer membrane vesicles as drug delivery carrier for photodynamic anticancer therapy. *Front Chem* 2023; 11: 1284292.
98. Xie J, Li Q, Haesebrouck F, Van Hoecke L VR. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends Biotechnol* 2022; 40:1173–94.
99. Nicolás-Ávila JÁ, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* 2017; 46:15–28.
100. Chen Q, Rozovsky S, Chen W. Engineering multi-functional bacterial outer membrane vesicles as modular nanodevices for biosensing and bioimaging. *Chem Commun (Camb)* 2017; 53:7569–72.
101. Young JL, Dean DA. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet* 2015; 89:49–88.
102. Gothelf A, Gehl J. What you always needed to know about electroporation-based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2012; 8:1694–702.
103. Ayed Z, Cuvillier L, Dobhal G, Goreham R. Electroporation of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* with gold nanoparticles. *SN Appl Sci* 2019; 1:1646.

- 104.Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, Nair R, Stevens MM. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release* 2015; 205:35–44.
- 105.Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev* 2010;9:425–74.
- 106.Chen J, Zhang H, Wang S, Du Y, Wei B, Wu Q, et al. Inhibitors of Bacterial Extracellular Vesicles. *Front Microbiol* 2022; 13:835058.
- 107.Zhang Y, Chen Y, Lo C, Zhuang J, Angsantikul P, Zhang Q, et al. Inhibition of Pathogen Adhesion by Bacterial Outer Membrane-Coated Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019;58):11404–8.
- 108.Li M, Zhou H, Yang C, Wu Y, Zhou X, Liu H, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *J Control Release* 2020; 323:253–68.
- 109.Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, Greene SE, Ford BA, Crowley JR, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:109ra115.
- 110.Schulz E, Goes A, Garcia R, Panter F, Koch M, Müller R, et al. Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *J Control Release* 2018; 290:46–55.
- 111.Huang W, Meng L, Chen Y, Dong Z, Peng Q. Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy. *Acta Biomater* 2022; 140:102–15.
- 112.Kulkarni HM, Nagaraj R, Jagannadham M V. Protective role of *E. coli* outer membrane vesicles against antibiotics. *Microbiol Res* 2015; 181:1–7.
- 113.Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* 1996 ;178:2767–74.
- 114.Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 2005;437:422–5.
- 115.Gan Y, Li C, Peng X, Wu S, Li Y, Tan JPK, et al. Fight bacteria with bacteria: Bacterial membrane vesicles as vaccines and delivery nanocarriers against bacterial infections. *Nanomedicine* 2021; 35:102398.
- 116.Aytar Çelik P, Derkus B, Erdogan K, Barut D, Enuh BM, Yildirim Y, et al. Bacterial membrane vesicle functions, laboratory methods, and applications. *Biotechnol J* 2021; 54:107869.
- 117.Ellis TN, Leiman SA, Kuehn MJ. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun* 2010;78:3822–31.
- 118.van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J* 2015;10:1689–706.
- 119.Collins BS. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov Med* 2011;12:7–15.
- 120.Unal CM, Schaar V, Riesbeck K. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin Immunopathol* 2011;33:395–408.
- 121.Kim OY, Hong BS, Park KS, Yoon YJ, Choi SJ, Lee WH, et al. Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *J Immunol* 2013;190:4092–102.
- 122.Lee WH, Choi HI, Hong SW, Kim KS, Gho YS, Jeon SG. Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Exp Mol Med* 2015;47: e183.
- 123.Chronopoulos A, Kalluri R. Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer. *Oncogene* 2020;39:6951–60.