

طراحی و سنتز ونکومایسین لیپوزومال و بررسی اثرات ضدباکتریایی آن بر استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

فاطمه یعقوبی نهاد^۱، بهین امید^{۲*}، فاطمه داوودی^۲

^۱ کارشناس ارشد زیست‌فناوری میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

چکیده

مقدمه: لیپوزوم‌ها به‌عنوان نانوحامل، سیستم پیشرفته‌ای را در حمل مولکول‌های زیستی مثل ادجوانت واکسن‌ها و داروهای ضدسرطانی، مواد ضدقارچی و مواد ضد درد ایجاد کرده‌اند. در این تحقیق ونکومایسین لیپوزومال تهیه و اثر ضد میکروبی آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بررسی شد که یکی از عفونت‌های مهم بیمارستانی محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش لیپوزوم‌ها با استفاده از روش آب‌افزایی و آب‌گرفتگی تهیه شدند. مورفولوژی سطحی آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM، سایز توسط DLS، پتانسیل زتا، پایداری لیپوزوم‌ها و میزان بارگیری دارو اندازه‌گیری شد. اثرات ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن و MIC به روش میکروداپلوشن انجام و نتایج با فرم اصلی دارو مقایسه شد.

یافته‌ها: ونکومایسین لیپوزومال در سنتزهای متعددی با نسبت DSPC:DCP:Cholesterol انجام شد که نسبت ۷:۲:۱ بهترین نتیجه را نشان داد که سایز آن با دستگاه DLS ۱۵۴ نانومتر و در SEM ۱۰۰ نانومتر و با پراکندگی یکسان و یکنواخت گزارش شد. میزان بارگیری دارو ۶۱/۶ درصد و پایداری لیپوزوم‌ها ۳۰ روز بوده است. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در نمونه‌ها ۱۹/۴۴ میلی‌متر در فرم آزاد و ۲۲/۷ میلی‌متر در فرم لیپوزومال بوده است. میزان MIC برای فرم آزاد ۲/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای فرم لیپوزومال ۲۷/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد فرم لیپوزومال ونکومایسین تا ۳۰ روز پایداری داشته و اثرات ضد میکروبی آن نتایج مناسب‌تری را نسبت به فرم آزاد ونکومایسین در برابر MRSA‌های جداسازی‌شده از بیمارستان نشان داده است.

کلمات کلیدی: MRSA، دارورسانی، لیپوزوم، ونکومایسین لیپوزومال

مقدمه

فناوری نوین نانو در دارورسانی شامل نانوساختارهایی است که مولکول‌های دارو را حمل می‌کنند. از این نانوحامل‌ها می‌توان نانولیپوزوم‌ها، میکروسفرها، نانوسفرها نیوزوم‌ها و ارکنوزوم‌ها را نام برد که دارورسان‌های موفق‌تری هستند و در درمان بیماری‌های مختلف مؤثر شناخته شده‌اند (۱، ۲). نانولیپوزوم یا وزیکول لیپیدی توده‌های تشکیل‌شده از دیسپرسیون‌های آبی مولکول‌های آمفی‌فیل مانند لیپیدهای قطبی هستند که به تشکیل ساختارهای دولایه تمایل دارند و کروی شکل هستند که به آن‌ها اسفرولیت می‌گویند. داخل آن‌ها فضایی وجود دارد که از آن برای بارگذاری مولکول‌های فعال زیستی استفاده می‌شود. با استفاده از این دارورسان، دارو در محل هدف رها می‌شود و اثربخشی بیشتری خواهد داشت (۳، ۴).

لیپوزوم‌ها از دو لایه فسفولیپیدی با هسته آب‌دوست تشکیل می‌شوند. از آنجایی که ساختار دولایه لیپیدی لیپوزوم‌ها شبیه غشای سلولی است و به آسانی می‌تواند به میکروب‌های پاتوژن الحاق شود (فیوژن)، در نتیجه لیپوزوم‌ها پرکاربردترین حامل برای داروهای ضد میکروبی مطرح می‌شوند (۵). از طرف دیگر، لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن ساختارهای وزیکوله، در محیط‌های دوفازی می‌توانند به‌عنوان حامل‌هایی برای هر دو گروه داروهای آب‌دوست و آب‌گریز عمل کنند. داروهای بسیار آب‌دوست عمدتاً در بخش مرکزی و آبی وزیکول قرار دارند و داروهای آب‌گریز میان دولایه لیپیدی به دام می‌افتند (۶).

چندین نوع مختلف از لیپوزوم‌ها با انواع مختلفی از ترکیبات لیپیدی به‌منظور دارورسانی داروهای شیمی‌درمانی در چندین بیماری به کار رفته است. برای تجویز سیستمیک بهتر است وزیکول‌های تک‌لایه کوچک (با اندازه متوسط ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر) به کار برود. اندازه‌های کوچک‌تر سبب افزایش زمان گردش آن‌ها در جریان خون و

افزایش حجم توزیع بیولوژیک لیپوزوم‌ها می‌شود و امکان خروج آن‌ها از عروق خونی و وارد شدن به فضای بیرون رگ را فراهم می‌کند (۷). اخیراً محققان توجه زیادی به فرم لیپوزومال داروهای ضد میکروبی دارند. از جمله پارامترهای مهمی که برای استفاده از لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های داروهای ضد میکروبی مطرح است می‌توان به خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیپیدها و داروها، اندازه و پلی‌دیسپرسیویتی ذره، بار سطحی (پتانسیل زتا)، پایداری هنگام ذخیره‌سازی و امکان تولید زیاد آن‌ها اشاره کرد (۸).

از جمله داروهای ضد میکروبی که فرم لیپوزومال آن‌ها تهیه شدند آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. از آنتی‌بیوتیک‌هایی که در حامل‌های لیپوزومی کپسوله شده‌اند می‌توان به پلی‌میکسین B، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، آمفوتریسین، جنتامایسین و بنزیل پنی‌سیلین اشاره کرد که فرمولاسیون‌هایی مؤثر، سالم و طبیعی برای درمان مؤثرتر بیماری‌های عفونی داشته‌اند (۹). مصرف فرم معمول این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل اثرات جانبی شدید محدودیت دارد، در حالی که فرم لیپوزومال آن‌ها به علت کم‌شدن دُز مصرف، منجر به کاهش چشمگیر اثرات جانبی و بهبود اثرات درمانی این داروها می‌شود. لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل چندین دارو به کار رفته‌اند تا سمیت آن‌ها را بکاهند یا دارو را در محل اثر آن تحویل دهند (۱۰).

در این تحقیق و نکومایسین لیپوزومال تهیه شد. و نکومایسین آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است و موجب مهار بیوسنتز پپتیدوگلیکان در باکتری می‌شود که داروی انتخابی و روش اصلی برای درمان MRSA است (۱۱-۱۲). امروزه روزانه میلیون‌ها نفر به بیماری‌های باکتریایی مبتلا می‌شوند. در مواردی به علت جراحی یا سوختگی، باکتری‌ها به پوست نفوذ می‌کنند و موجب عفونت زخم‌ها می‌شوند (۱۳). یکی از باکتری‌هایی که هم عامل بیماری‌های

راهکارهای متنوعی را معرفی می‌کند. نانوفناوری با ابداع روش‌های جدید در دارورسانی و استفاده از نانوحامل‌های دارویی قابلیت استفاده دژهای بیشتر دارو را از طریق بهبود فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک و کاهش سمیت دارو فراهم کرده است (۱۸). یکی از استراتژی‌هایی که می‌تواند به افزایش کارآمدی خاصیت ضدباکتریایی یک آنتی‌بیوتیک منجر شود، انکپسوله کردن آنتی‌بیوتیک در یک ساختار لیپوزومی است (۱۹). به‌دوام‌افتادن دارو درون لیپوزوم می‌تواند تا میزان قابل توجهی از سمیت داروها بکاهد و در نتیجه می‌توان با استفاده از آن دژهای بیشتری از دارو را استفاده کرد (۷). در این تحقیق ونکومایسین که داروی انتخابی درمان MRSA است لیپوزومه شده و تأثیر آن بر باکتری MRSA جدا شده از عفونت‌های بیمارستانی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

ساخت ونکومایسین لیپوزومه

در سیستم‌های دارورسانی لیپوزومی، در سنتز محصولات دو هدف مهم مورد توجه است؛ اول سنتز لیپوزوم‌های مورد نظر و دوم بازده به‌دوام‌انداختن دارو درون آن‌ها یا به‌اصطلاح بارگیری دارو درون لیپوزوم‌ها. روش‌های بسیار متنوعی برای تهیه لیپوزوم‌ها ابداع شده است، اما تعداد محدودی از آن‌ها قادر به به‌دوام‌انداختن (Entrapping) مقادیر زیاد داروهای محلول در آب هستند. روشی مناسب‌تر است که از یک طرف لیپوزوم‌هایی با اندازه مورد نظر تولید شود و از طرف دیگر راندمان بارگیری دارویی خوبی داشته باشد. این روش‌ها عمدتاً به دو دسته تقسیم می‌شوند؛ یکی روش‌هایی که برای اصلاح فیزیکی دو لایه‌ای موجود به کار می‌روند و دیگری روش‌هایی که با خارج‌سازی یک عامل حل‌کننده چربی منجر به تولید دو لایه جدید می‌شوند (۲۰). از این رو انتخاب روش سنتز

اکتسابی و هم بیمارستانی است و در سوختگی‌ها هم باعث عفونت زخم‌ها می‌شود، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) است که با وجود داروهای موضعی و سیستمیک برای کاهش عفونت، همچنان درمان آن با مشکلاتی همراه است. *استافیلوکوکوس اورئوس* نوعی پاتوژن درون سلولی و برون سلولی شناخته شده است که می‌تواند درون ماکروفاژها وارد شود و از نابود شدن توسط سیستم ایمنی مصون بماند (۱۴). متأسفانه در بیش از ۵۰ درصد از موارد، *استافیلوکوکوس اورئوس*‌ها به متی‌سیلین مقاوم می‌هستند.

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) مسئول اصلی شمار زیادی از عفونت‌های حاد بیمارستانی است و به‌عنوان تهدیدی برای سلامت عمومی شناخته می‌شود. این باکتری به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۱۵). سوبه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ژن *mec A* دارند. این ژن پروتئینی به نام PBP2a (پروتئین‌های باندشونده به پنی‌سیلین) را کد می‌کند که میل ترکیبی آن در اتصال به متی‌سیلین کمتر از سایر پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین در دیواره باکتری است. سوبه‌هایی که این ژن را دارند، به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر نیز مقاومت نشان می‌دهند و مقاومت چند دارویی (MDR: Multiple drug resistance) ایجاد می‌شود (۱۶).

مطالعات نشان داده‌اند MRSA معمولاً تا حدودی به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند ونکومایسین (Vancomycin)، لینزولید (Linezolid) و داپتومایسین (Daptomycin) حساس است (۱۷). از نکات مهم در درمان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، دژ مصرفی دارو است که در درمان عفونت‌ها مصارف زیاد دارو عوارض جانبی زیادی را برای بیمار ایجاد می‌کند. به‌منظور برطرف شدن این مشکلات نانوفناوری

جدول ۱: خلاصه مراحل کلی سنتز لیپوزومها

مراحل سنتز	توضیح
خشک کردن چربی از حلال آلی	ابتدا باید مولکولهای چربی یا فسفولیپید را در یک محلول آلی حل کرد. در مرحله بعدی باید این محلول آلی را با یک محلول آبی جایگزین کرد در نتیجه حلال آلی که مولکولهای چربی یا فسفولیپید در آن حل شده را از محیط محلول به وسیله تبخیر یا غیره خارج میکنند.
پراکندگی چربی در محیط آبی	در این مرحله محلول آبی را جایگزین محلول آلی میکنند تا مولکولهای چربی در درون این محیط پراکنده شده و تشکیل لیپوزومهای متنوعی با ابعاد و لایه های مختلف بدهند.
تخلیص لیپوزومهای حاصل آنالیز محصولات نهایی	حال باید لیپوزومهای با اندازه و نوع مورد نظر را از بین محصولات سنتزی مختلف تخلیص گردد در مرحله آخر باید خواص و ویژگیهای این لیپوزومهای خالص شده را با استفاده از ابزار و تکنیکهای مختلف شناسایی شوند

میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد. پس از فریز کردن، به مدت ۲۴ ساعت داخل دستگاه فریزدرایر قرار داده و پودر به دست آمده برای آزمایش های بعدی استفاده شد. برای نگهداری طولانی مدت از لیپوزوم تهیه شده، از آن ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

به منظور استفاده مجدد و انجام آزمون ها ابتدا پودر به دست آمده با مقدار مناسب آب (در هر نوبت حدود ۲۰۰ میکرولیتر) ترکیب و بعد از ورتکس شدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه انکوبه شد. سپس این مراحل یک بار دیگر با ۲۰۰ میکرولیتر از PBS تکرار و در نهایت به آن حدود ۱/۶ میلی لیتر از PBS اضافه و بعد از ورتکس کردن به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ کردن با دور بالا (۱۸۰۰۰×g) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، رسوب به دست آمده با PBS شسته و برای استفاده در مقادیر مورد نظر از PBS دیسپرس شد. برای گروه کنترل تمامی مراحل انجام شده این بار به جای ونکومایسین با آب مقطر انجام شد.

آزمون های تأییدی ونکومایسین لیپوزومه

مورفولوژی سطحی لیپوزومها

مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM بررسی شد. بدین منظور چند قطره لیپوزوم حاوی ونکومایسین حاصل از مرحله سنتز روی لام شیشه ای ریخته

اهمیت بسزایی دارد. روش کلی سنتز لیپوزومها را می توان در ۳ یا ۴ مرحله طبق جدول ۱ خلاصه کرد.

در این تحقیق برای انجام آزمایش، لیپوزومهای مورد نظر با استفاده از 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC)، (DCP) Dicethylphosphate و کلسترول در نسبت مولاریته ۷:۲:۱ با روش آب افزایی و آب گرفتگی تهیه شدند. برای این منظور محلول ۷۰ میکرومولار DSPC، محلول ۲۰ میکرومولار DCP و ۱۰ میکرومولار کلسترول در ۲ میلی لیتر کلروفرم تهیه و داخل یک بالن ریخته شد و در دستگاه Rotary evaporator در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد تحت خلأ کنترل شده قرار گرفت و فیلم لیپیدی تهیه شد. پس از دمیدن گاز نیتروژن به آن به منظور حذف کلروفرم باقی مانده، با ۲ میلی لیتر از محلول سوکروز در آب (با نسبت برابر سوکروز به لیپید استفاده شده) از دیواره بالن جدا شد. سوسپانسیون لیپیدی تهیه شده حدود ۲ دقیقه ورتکس شد. سپس با استفاده از سونیکاتور پروب دار به مدت ۵ دقیقه، دوره های ۴۰ ثانیه سونیکه و ۲۰ ثانیه استراحت، به منظور جلوگیری از افزایش بیش از حد دما و انرژی در ترکیب تحت سونیکه با توان ۴۰۰۰ هرتز، تحت سونیکه شدن قرار گرفت. در نهایت ترکیب تهیه شده به منظور جداسازی لیپوزومهای درشت به مدت ۴ دقیقه و با دور کم (۴۰۰×g) سانتریفیوژ شد و به مایع رویی ۱ میلی لیتر از ونکومایسین با غلظت ۵۰

و به مدت یک روز در دمای اتاق قرار داده شد تا خشک شود. سپس با دستگاه میکروسکوپ الکترونی SEM بررسی شد.

پراکندگی نور دینامیکی یا DLS

برای بررسی سایز لیپوزوم از DLS استفاده شد. پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع قطر ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود (۱۸). بدین منظور ۲ سی‌سی از لیپوزوم حاوی داروی ونکومایسین مورد نیاز است. در صورت غلیظبودن نمونه می‌توان آن را با آب مقطر یا نیترات پتاسیم رقیق کرد.

تعیین مقدار پتانسیل زتا

پتانسیل زتا برای درک و کنترل خواص سوسپانسیون‌های کلئیدی بسیار اهمیت دارد. عموماً می‌توان خصوصیات یک سوسپانسیون را با درک چگونگی برهم‌کنش کلئیدها با یکدیگر شناسایی کرد. در برخی موارد لازم است برای جدا نگه‌داشتن ذرات از یکدیگر و ممانعت از تجمع آن‌ها دافعه بین ذرات به حداکثر مقدار ممکن برسد. گاهی نیز هدفی کاملاً متفاوت دنبال می‌شود و با حذف یا کاهش نیروهای دافعه، تشکیل توده‌های بزرگ تسریع و عمل صاف‌شدن آسان‌تر می‌شود. با تغییر تعادل بین نیروهای دافعه و جاذبه بین ذرات می‌توان ویسکوزیته محلول را تغییر داد و آن را تعدیل کرد (۲۱). با استفاده از دستگاه زتامتر، از همان نمونه‌ای که برای تعیین سایز انتخاب شده است، پتانسیل زتا اندازه‌گیری شد.

بررسی پایداری لیپوزوم

به‌منظور بررسی پایداری، محلول لیپوزومی در دمای محیط و دور از نور نگهداری شد. همچنین از مخلوط‌کردن و تکان‌دادن محلول خودداری شد؛ زیرا تکان‌دادن باعث ناپایداری لیپوزوم‌ها می‌شود (۲۲-۱۸). سپس با استفاده از

DLS و همچنین اندازه‌گیری مقدار بارگیری دارو، میزان پایداری در زمان‌های مختلف بررسی شد.

تعیین میزان بارگیری ونکومایسین در لیپوزوم به روش اولترافیلتراسیون

ابتدا یک سی‌سی از محلول لیپوزوم حامل دارو در فیلترهای آمیکون ۳ کیلودالتون ریخته شد و با دور ۱۵۰۰ تا ۱۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول خروجی از فیلترها با داروی ونکومایسین بارگیری نشد و جذب آن باید در طول موج جذبی دارو (۲۸۰ نانومتر) با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده می‌شد. سپس جذب به‌دست‌آمده در معادله خط نمودار استاندارد تهیه‌شده قرار داده شد تا غلظت به‌دست آید. برای محاسبه مقدار داروی بارگیری‌شده از روش زیر استفاده شد. البته با توجه به اینکه محلول خروجی از فیلتر آمیکون کم بود، محلول خروجی با حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر با آب رقیق شد. جذب به‌دست‌آمده در فرمول معادله خط قرار داده شد تا مقدار دارو در محلول خروجی رقیق‌شده محاسبه شود (A). سپس در نسبت رقیق‌شده ضرب شد (B) تا مقدار داروی بارگیری‌نشده در هر ۱ سی‌سی محلول سنتز شده به‌دست آید. سپس این عدد در ۳۵ ضرب شد که مقدار کل محلول (C) است تا مقدار داروی بارگیری‌نشده در کل محلول (X) به‌دست آید. این عدد کل (X) بر مقدار کل دارو (Y) تقسیم و در ۱۰۰ ضرب شد تا درصد مقدار داروی بارگیری‌نشده (M) در کل محلول به‌دست آید (۸، ۱۸، ۱۹).

$$A \times B \times C = X$$

$$X/Y \times 100 = M$$

آزمون‌های ضد میکروبی

آزمون آنتی‌بیوگرام به روش Disk diffusion

تعداد ۹ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین که از آزمایشگاه‌های سطح شهر تهران جداسازی

هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف و نکومایسین لیپوزوم و غیرلیپوزوم در میکروپلیت ترکیب شدند (۱۵). برای کنترل مثبت از محیط نوترینت براث به همراه سوسپانسیون باکتری و برای کنترل منفی از محیط نوترینت براث به همراه دارو استفاده شد. در ادامه میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت برای ارزیابی MIC، جذب نوری با استفاده از الیزا ریدر با طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد.

برای تعیین MBC ۱۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که به‌عنوان MIC تعیین شدند و غلظت قبل و بعد آن روی محیط نوترینت آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس MBC بر اساس تعداد کلنی (کمتر از ۵ کلنی) تعیین شد. آزمایش‌ها با ۳ بار تکرار انجام شد.

نتایج

سنتز لیپوزوم حاوی و نکومایسین

نتایج سنتزهای اول و دوم

این دو نمونه به‌صورت دستی سنتز شدند. از این دو نمونه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) گرفته شد و سنتز شدن لیپوزوم را تأیید کرد، اما نتایج قابل قبولی نداشتند و پیک سایزها در محدوده میکرون بود. با این حال نشان داده شد با روش دستی نیز می‌توان لیپوزوم‌هایی در سایز نانو سنتز کرد و در صورت بهتر کردن شرایط می‌توان نتایج مطلوبی به‌دست آورد (نمودارهای ۱ و ۲).

نتایج سنتز سوم، چهارم و پنجم

همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، در این دو سنتز از مقدارهای بیشتر کلسترول با نسبت ۴:۲:۲ از

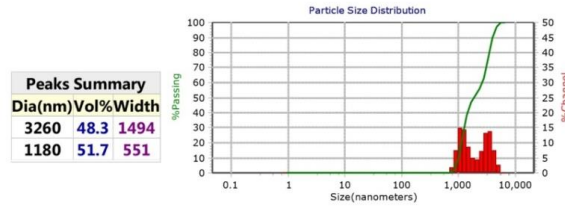
شده و آزمون شناسایی و وجود ژن *mecA* در آن‌ها اثبات شده بود، از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تهران تهیه شد. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک در آگار و روش Kirby-Baure روی محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) انجام شد (۱۵). در این روش از سوسپانسیونی از باکتری‌ها معادل با کدورت نیم مک فارلند تهیه و با کمک سوپ استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس‌از آن با استفاده از پنس استریل، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی دیسک‌های و نکومایسین، پنی‌سیلین و تتراسایکلین (روسکو، دانمارک) روی سطح محیط کشت قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و طبق جدول استاندارد CLSI تفسیر شد. کنترل کیفی دیسک‌ها نیز با استفاده از ایزوله استاندارد *Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC25923* انجام گرفت.

در ادامه به‌منظور مقایسه و نکومایسین آزاد و لیپوزوم و بررسی عملکرد و نکومایسین لیپوزوم از دیسک بلانک استفاده شد. گروه اول به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از و نکومایسین آغشته شد. گروه دوم از لیپوزوم حاوی دارو استفاده شد که ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نکومایسین داشت (که میزان مورد نیاز لیپوزوم با استفاده از میزان بارگذاری شده و نکومایسین محاسبه شده بود). گروه سوم برای کنترل از مقدار برابر لیپوزوم بدون آنتی‌بیوتیک استفاده و دیسک‌ها روی پلیت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

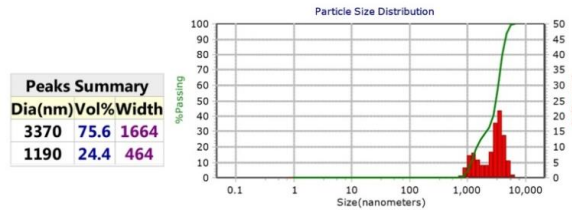
سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل

غلظت کشندگی (MBC)

برای سنجش حداقل غلظت بازدارندگی از روش میکرودیالوشن استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر محیط مولر



نمودار ۱: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز اول



نمودار ۲: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز دوم

جدول ۲: خلاصه نتایج سنتز لیپوزوم

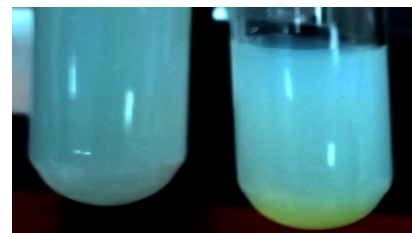
شماره سنتز	نسبت DSPC:DCP:Cholesterol	میزان مجموع لیپید (میلی گرم)	سایز (نانومتر)	بارگیری (درصد)	پایداری (روز)
سنتز ۱	۴:۲:۱	۴	۳۲۶۰-۱۱۸۰	۲۲/۷	۱۵
سنتز ۲	۴:۲:۱	۸	۳۳۷۰-۱۱۹۰	۳۴/۷	۵
سنتز ۳	۴:۲:۲	۴	-	-	ناپایدار
سنتز ۴	۴:۲:۲	۸	-	-	ناپایدار
سنتز ۵	۴:۲:۴	۴	-	-	ناپایدار
سنتز ۶	۷:۴:۲	۷	۳۸۷	۶۵	۲۳
سنتز ۷	۷:۴:۲	۱۴	۵۰۶	۶۸/۲	۲۰
سنتز ۸	۷:۲:۱	۷	۱۵۴	۶۱/۶	۳۰
سنتز ۹	۷:۲:۱	۱۴	۱۷۵/۹	۶۶/۵	۳۰

انتهای لوله نشانه ته نشین شدن لسیتین است. در سنتز پنجم افزایش کلاسترول به ۳۳ درصد از مقدار کلاسترول، باعث ناپایداری لیپوزومی شد.

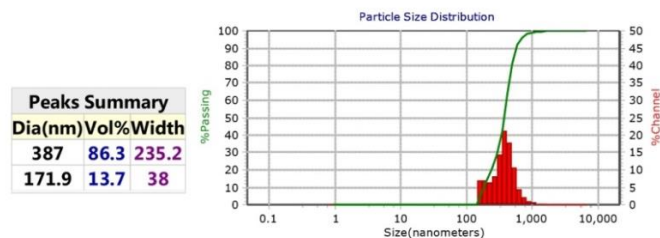
نتایج سنتزهای ششم و هفتم

در نهایت این نتیجه حاصل شد که کاهش مقدار DCP در افزایش میزان پایداری لیپوزومها مؤثر است. از این رو سنتزهای مقایسه‌ای با نسبت ۷:۴:۲ از DSPC:DCP:Cholesterol انجام شد (جدول ۲). این دو سنتز مقدار بارگیری بیشتری از دارو را داشته است. در چند سنتز

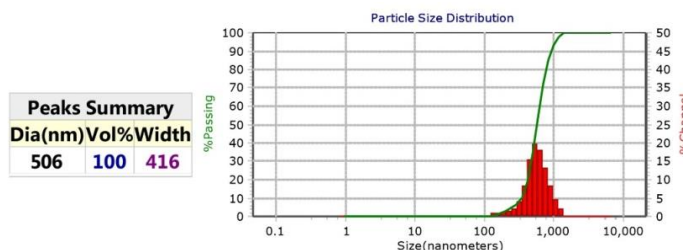
DSPC:DCP:Cholesterol استفاده شد و ناپایداری لیپوزومها چندین دقیقه پس از سنتز مشاهده شد. در سنتز سوم ۳ تا ۵ دقیقه و در سنتز چهارم حدود ۱۵ تا ۲۰ دقیقه پس از سنتز پایداری ثبت شد. در شکل ۱، هاله زرد رنگ



شکل ۱: رسوب لیپوزوم



نمودار ۳: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز ششم



نمودار ۴: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز هفتم

میزان قابل قبول از داروی بارگذاری شده و اندازه مناسب، حدود ۱۵۴ نانومتر به عنوان سنتز نهایی برای انجام آزمون‌های *in vitro* استفاده شد (شکل ۲). سایز لیپوزومها در سنتز نهم حدود ۱۰۷ نانومتر بود، ولی با توجه به پراکندگی سایز (PDI) برابر با ۱/۰۰ در DLS، نمونه با آب مقطر رقیق و سریعاً DLS گرفته شد که در نتیجه آن PDI به ۰/۳۸۱ کاهش یافت، ولی رقیق سازی باعث افزایش سایز هیدرودینامیک شد که باعث افزایش سایز لیپوزومی به سایز نهایی ۱۷۶ نانومتر شد (نمودارهای ۵ و ۶).

از همین رو برای تعیین و تأیید سایز سنتز هشتم،



شکل ۲: شفافیت سنتز هشتم بعد از یک ماه که نشان دهنده پایداری زیاد آن است.

انجام شده بعد از حدود ۷ تا ۸ روز کدورت و در نتیجه ناپایداری محلول لیپوزومی مشاهده شد. در نهایت از سنتز ششم به بعد، با کاهش مقدار DCP نسبت به DSPC پایداری افزایش می یابد و افزایش کدورت و در نتیجه ناپایداری بعد از حدود ۲۰ تا ۲۳ روز شاهد افزایش کدورت و ناپایداری خواهیم بود. همچنین این سنتزها میزان بارگذاری مناسبی در حدود ۶۵ و ۶۸/۲ درصد داشتند (نمودارهای ۳ و ۴).

نتایج سنتزهای هشتم و نهم

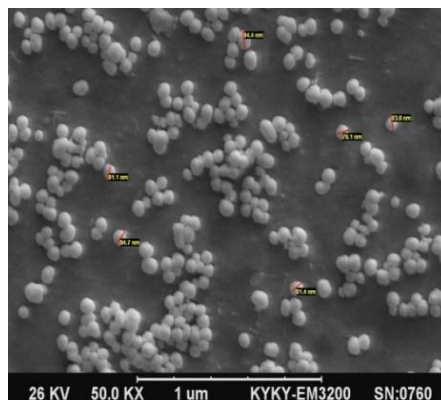
مقدار لیپوزومها با سایزهای بسیار بزرگ در سنتزهایی با نسبت ۷:۲:۱ از DSPC:DCP:Cholesterol بسیار کم بود و اندازه مناسبی داشتند. همچنین میزان بارگیری دارو در این دو سنتز به میزان قابل توجهی از مقدار کل دارو به میزان ۶۱/۶ و ۶۶/۵ درصد بود و پایداری مناسبی تا ۳۰ روز داشت. همچنین بعد از این مدت و نگهداری دارو در دمای ۴- درجه سانتی گراد، میزان بارگذاری دارو تغییر کمی کرد و به ۵۵ درصد رسید.

در نهایت سنتز هشتم به دلیل داشتن پایداری مناسب

یعنی نانوذرات سنتز شده تقریباً همگی سایز یکسانی دارند. همچنین شکل نشان می‌دهد نانوذرات سنتز شده کاملاً یکنواخت حل شده‌اند.

نتایج بررسی شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات سنتز شده توسط DLS

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. در فناوری‌های اخیر، ذراتی با قطر کمتر از نانومتر نیز با این روش قابل اندازه‌گیری هستند. این روش به برهم‌کنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده به وسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. همان‌طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود، قطر نانوذره حدود ۱۵۴ نانومتر است. از آزمایش SEM نیز متوجه شدیم قطر نانوذره ۱۰۰ نانومتر است. اختلاف بین نتایج DLS و SEM به این دلیل

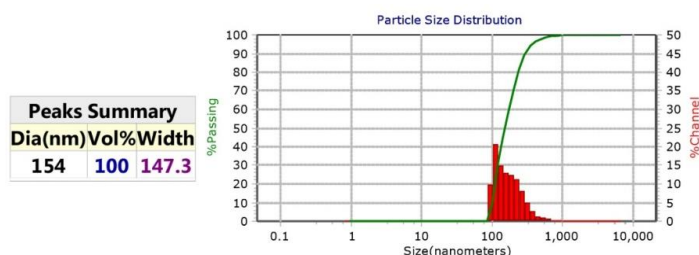


شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات ساخته شده (قطر تقریبی حدود ۱۰۰ نانومتر است).

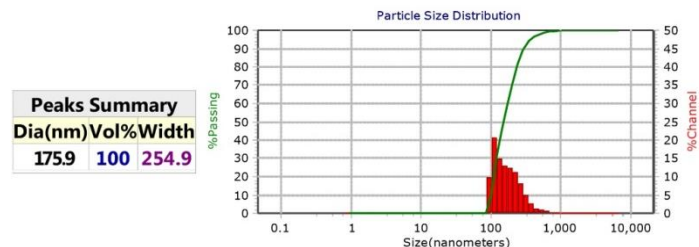
تصویر SEM گرفته شد که در شکل ۳ مشاهده می‌شود و سایز حدود ۱۰۰ نانومتر است.

نتایج بررسی قطر و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده توسط SEM

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، قطر نانوذرات ساخته شده حدود ۱۰۰ نانومتر است. همچنین این شکل نشان می‌دهد نانوذرات سنتز شده همگن هستند؛



نمودار ۵: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز هشتم (سنتز نهایی تأیید شده)



نمودار ۶: نتیجه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) سنتز نهم

است و از ۲۰ میلی‌ولتی که گزارش شده بیشتر است. در نتیجه این بار به اندازه کافی زیاد است. اگر این میزان کمتر از ۲۰ بود، بارهای منفی یکدیگر را دفع نمی‌کردند. این اندازه نشان می‌دهد دافعه بین بارها به حدی است که می‌توانند همدیگر را دفع کنند. در نتیجه از ایجاد تجمع جلوگیری می‌کنند. پس می‌توان نتیجه گرفت بار ایجاد شده روی نانوذرات باعث می‌شود حالت دیسپرس داشته باشد؛ یعنی تجمع نداشته باشد که این خود نشان‌دهنده یا تأییدی بر داده‌های DLS و SEM و تأییدکننده میزان پایداری نانوذره به مدت ۳۰ روز است.

نتایج میزان بارگیری

مقایسه آماری مقدار لیپید استفاده شده با میزان بارگیری

همان‌طور که در نمودار ۷ مشاهده می‌شود، مقدار بارگیری تحت تأثیر نسبت DSPC:DCP و مقدار کلی لیپید استفاده شده قرار گرفته است. نمودار ۸ رگرسیون خطی بین میزان لیپید استفاده شده و بارگیری را نشان می‌دهد. رگرسیون خطی همبستگی بین دو متغیر را نشان می‌دهد و بیان می‌کند تغییرات یک متغیر مستقل بر متغیر وابسته تأثیرگذار است یا خیر. همچنین نشان می‌دهد این تأثیر در

است که DLS شعاع هیدرودینامیک را در نظر می‌گیرد. به عبارتی دیگر، شعاع نانوذره به علاوه شعاع آبی می‌شود که اطراف نانوذره قرار دارد، برای همین قطر نانوذره در DLS بیشتر از دستگاه SEM است.

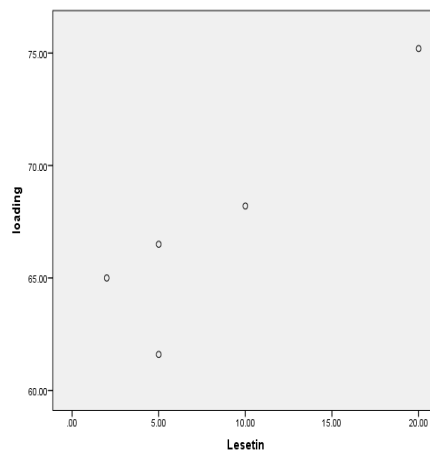
همچنین نمودار ۵ نشان‌دهنده این است که نانوذرات به صورت هموزن هستند و قطری تقریباً یکسان دارد. اگر هموزن نبودند، معمولاً در ناحیه دیگر هم باید ستون وجود داشت. پس می‌توان نتیجه گرفت داده‌های DLS، داده‌های میکروسکوپ الکترونی را تأیید کرده است.

نتایج بررسی zeta potential (بار) نانوذرات سنتز شده توسط DLS

پتانسیل زتا (Zeta potential) در اصطلاحات علمی برای اشاره به پتانسیل الکتریکی در حلالیت کلوئیدی به کار می‌رود (۲۱). پتانسیل زتا برای نانو لیپوزوم سنتز شده حدود ۳۳- میلی‌ولت است و محلول بار منفی دارد. تفسیر این عدد این است که در مطالعات مختلفی گزارش شده است اگر پتانسیل زتا از حدود ۲۰ بیشتر باشد، به اندازه کافی بین ذرات دافعه وجود دارد که همدیگر را دفع کنند و در نتیجه به یکدیگر نمی‌چسبند یا تجمع نمی‌کنند. در این پژوهش پتانسیل زتا نشان‌دهنده حدود ۳۳- میلی‌ولت بوده



نمودار ۷: نمودار بارگیری-سنتزهای موفق



نمودار ۸: رگرسیون لیپید-بارگیری

دو متغیر است و هرچه بیشتر باشد، یعنی سطح اختلاف دو متغیر کمتر است. میزان تعیین معناداری و اختلاف بین دو متغیر در علوم زیستی $0/05$ در نظر گرفته می‌شود؛ بدین معنی که اگر sig کمتر از $0/05$ باشد، یعنی بین دو متغیر اختلاف معنی‌دار و قابل مقایسه‌ای وجود دارد.

مقایسه آماری اندازه نانو ذره با میزان بارگیری

همان‌طور که در نمودار ۹ مشاهده می‌شود، بین سایز و بارگیری رابطه مستقیمی مشاهده نمی‌شود و نمودار ۱۰ همبستگی خطی و مثبت را بین این دو متغیر نشان نمی‌دهد.

عدد R Square در جدول ۴ به میزان $0/397$ است که نبود رابطه خطی را بین سایز و بارگیری نشان می‌دهد. عدد

جهت مثبت خواهد بود یا منفی. در نمودار ۷ نشان داده شده است که بین مقدار لیپید استفاده‌شده و میزان بارگیری همبستگی مثبت وجود دارد؛ یعنی با کاهش مقدار میزان لیپید استفاده‌شده بارگیری کاهش و با افزایش آن بارگیری افزایش می‌یابد.

در جدول ۳، عدد R Square برابر با $0/825$ است و نشان می‌دهد بین لسیتین و بارگیری رابطه خطی وجود دارد. مقدار sig نیز $0/033$ است که از $P < 0/05$ کمتر است که اختلاف معنی‌دار بین بارگیری سنتزها را نشان می‌دهد که میزان لیپید متفاوتی دارند. R Square نشان‌دهنده رابطه خطی بین دو متغیر و بین صفر و یک است. هرچه این عدد به یک نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده رابطه خطی بین دو متغیر است. Sig نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین

جدول ۳: بررسی آماری میزان لیپید-بارگیری

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	0/908 ^a	0/825	0/767	2/43401

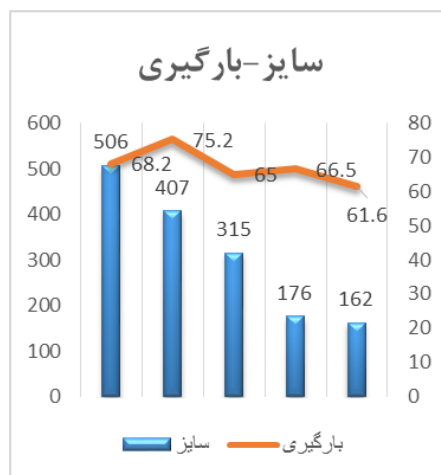
a. Predictors: (Constant), Lesetin

ANOVA^a

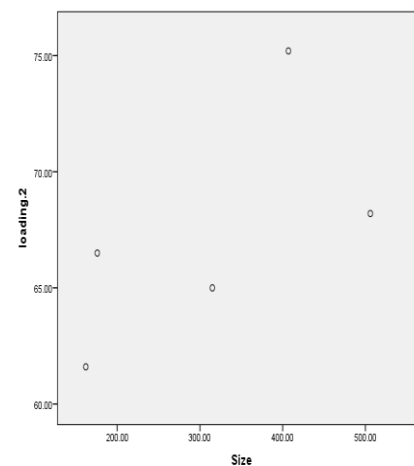
Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	83/867	1	83/867	14/156	0/033 ^b
Residual	17/773	3	5/924		
Total	101/640	4			

a. Dependent Variable: loading

b. Predictors: (Constant), Lesetin



نمودار ۹: رابطه بارگیری-سایز



نمودار ۱۰: رگرسیون خطی سایز-بارگیری

جدول ۴: بررسی آماری سائز-بارگیری

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	0/630 ^a	0/397	0/197	4/51824

a. Predictors: (Constant), Size

Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	40/397	1	40/397	1/979	0/254 ^b
Residual	61/243	3	20/414		
Total	101/640	4			

a. Dependent Variable: loading.2

b. Predictors: (Constant), Size

تنها هنگام استفاده از دیسک ونکومايسين مشاهده شد. شکل ۵ عملکرد موفقیت‌آمیز ونکومايسين لیپوزومه را در آزمایش آنتی‌بیوگرام نشان می‌دهد. در اطراف گروه کنترل به دلیل نبود هرگونه ماده ضدباکتری هاله‌ای مشاهده نشد. در صورتی که در اطراف دو دیسک حاوی ونکومايسين آزاد و لیپوزمه هاله حاصل از عدم رشد باکتری مشاهده شد. نکته قابل توجه این است که ونکومايسين لیپوزومه به خوبی جلوی رشد باکتری را گرفته و حتی هاله‌ای بزرگ‌تر از حالت استفاده از ونکومايسين آزاد ایجاد کرده است.

حداقل غلظت مهاري (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در سویه MRSA، در غلظت‌های کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم

در جدول ۴ Anova به میزان ۰/۲۵۴ است که از $P < 0/05$ بیشتر است و نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین سائز لیپوزومه‌ها و میزان باگیری آن‌ها وجود ندارد؛ به این معنی که کاهش سائز، لزوماً باعث کاهش بارگیری نمی‌شود.

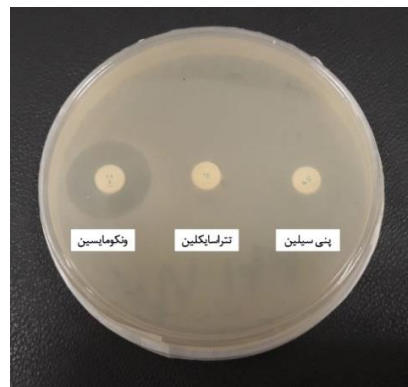
نتایج مطالعات بیولوژیکی

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام به روش Disk Diffusion

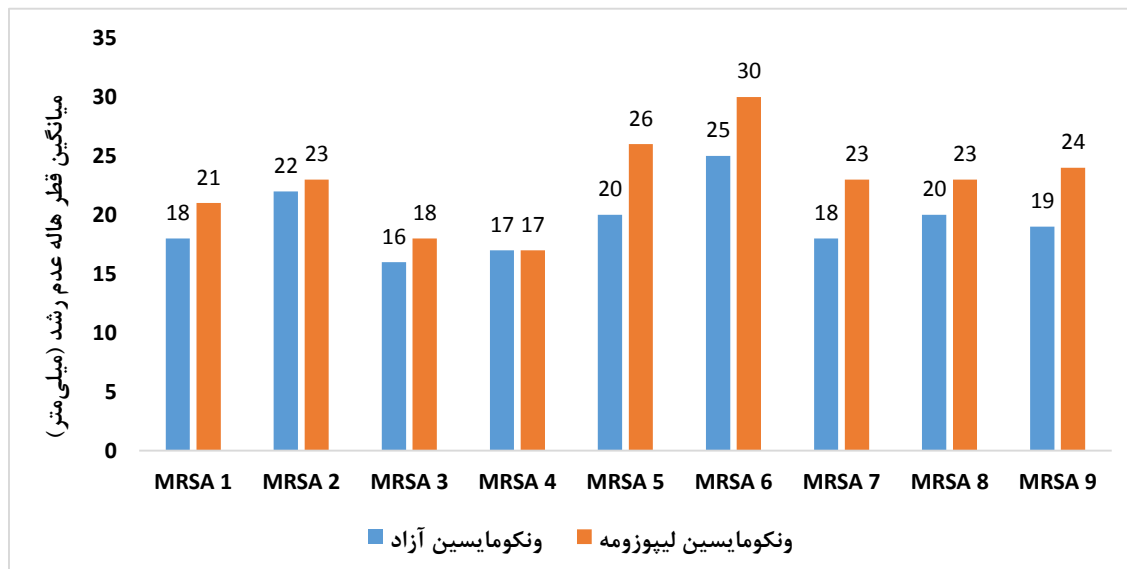
به منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های MRSA مطالعه شده، الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن روی محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) و با استفاده از سوسپانسیون باکتریایی برابر با کدورت نیم مک فارلند مطالب استاندارد توصیه شده CLSI با استفاده از دیسک‌های ونکومايسين، پنی‌سیلین و تتراسایکلین (روسکو، دانمارک) تعیین شد. طبق شکل ۴، حساسیت



شکل ۵: آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن به منظور مقایسه ونکومايسين لیپوزومه و آزاد



شکل ۴: آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن به منظور بررسی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین MRSA



نمودار ۱۱: میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های MRSA در برابر ونکومايسين آزاد و ونکومايسين لپپوزومال

مثبت و منفی استفاده شد. همچنین از یک گروه لپپوزوم بدون آنتی‌بیوتیک نیز استفاده شد که هیچ‌گونه خاصیت آنتی‌باکتریالی از آن مشاهده نشد. محل تقاطع نمودار با محور افقی نشان‌دهنده میزان MIC است. مقدار MIC ونکومايسين لپپوزوم برای MRSA به میزان $0/6$ و برای ونکومايسين آزاد به میزان $2/5$ میلی‌گرم بر لیتر است (جدول ۵). به‌منظور تأیید بیشتر بازده ضدباکتری نمونه‌های تهیه‌شده، تراکم نور (OD) نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ (Thermo NanoDrop, OneC Spectrophotometer Scientific, در

بر لیتر از ونکومايسين آزاد و کمتر از حدود $0/3$ میلی‌گرم بر لیتر از ونکومايسين لپپوزوم، رشد باکتری‌ها وجود داشت. کاهش زنده‌مانی این باکتری با افزایش مقدار نانولپپوزوم ونکومايسين به‌طور قابل ملاحظه‌ای مشهود بود. بیشترین میزان کم‌شدن زنده‌مانی هنگامی مشاهده شد که میزان نانولپپوزوم ونکومايسين به $0/5$ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت ونکومايسين آزاد به 2 میلی‌گرم بر لیتر رسید و محلول کاملاً شفاف بود. محلول میکروب‌ها در محلول BHI و محلول BHI بدون باکتری به ترتیب به‌عنوان کنترل

جدول ۵: میزان MIC محاسبه‌شده برای نمونه‌های ونکومايسين آزاد و لپپوزوم در سایر باکتری‌های MRSA

شماره نمونه باکتری	لیپوزوم کنترل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	ونکومايسين لپپوزوم (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	ونکومايسين آزاد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
MRSA1	-	$1/25$	۵
MRSA2	-	۱	۴
MRSA3	-	$1/5$	۵
MRSA4	-	$1/5$	$4/5$
MRSA5	-	$1/25$	$4/5$
MRSA6	-	$0/8$	۳
MRSA7	-	$1/25$	۴
MRSA8	-	۱	$3/5$
MRSA9	-	$1/25$	۵

به آهستگی صورت می‌گیرد. این نتایج نشان می‌دهد احتمالاً MRSA نسبت به غلظت‌های زیاد نانولیپوزوم و نکومایسین تا حدودی پایدار است و خاصیت باکتری‌کشی در غلظت‌های کمتر، نسبت به مقادیر زیاد آن، بیشتر مشاهده می‌شود.

با توجه به آزمون‌های انجام‌شده، هر دو مقادیر MIC و MBC به دست‌آمده برای نکومایسین لیپوزومه ۲ تا ۴ برابر کمتر از همان مقادیر برای نکومایسین آزاد محاسبه شده است. حداقل غلظت کشندگی طبیعتاً از MIC کمتر بوده و مقادیری بین ۱/۲۵-۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر برای نکومایسین لیپوزومه و ۵-۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر برای نکومایسین آزاد نشان داده شده است (جدول ۶ و شکل‌های ۶ و ۷).

۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری و قابلیت زنده‌ماندن سلول‌های MRSA با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

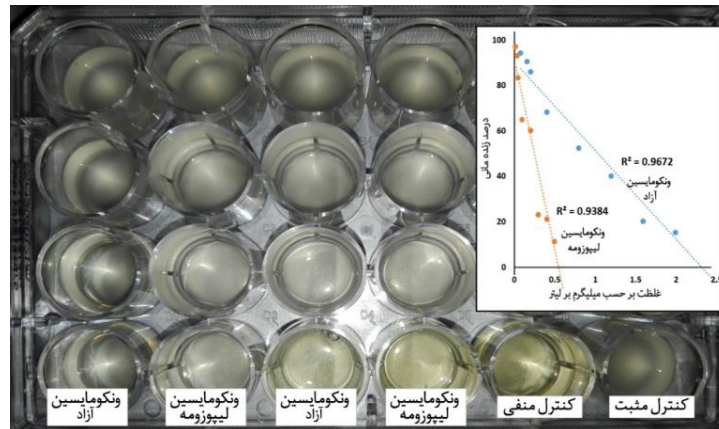
درصد زنده‌مانی سلول = تراکم نوری محلول براث در ۶۲۰ نانومتر ÷ تراکم نوری محلول کنترل مثبت براث در ۶۲۰ نانومتر × ۱۰۰

برای تأیید بیشتر راندمان ضدباکتری، آزمایش MBC با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از هر محیط کشت از لوله آزمایش روی پلیت نوترینت آگار انجام شد.

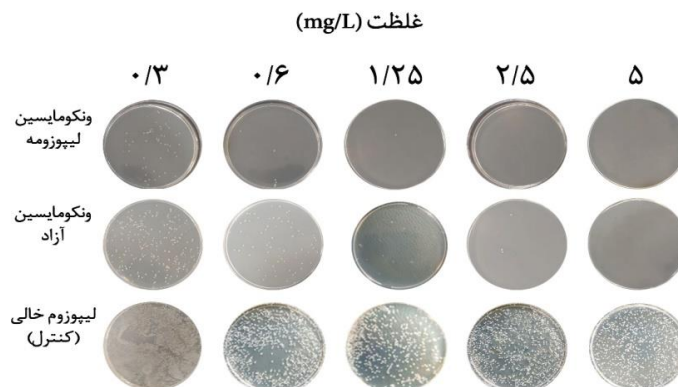
MIC نکومایسین لیپوزومه برای MRSA به میزان ۰/۶ و برای نکومایسین آزاد به میزان ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر است. زنده‌مانی MRSA نوعی رفتار لگاریتمی را نشان می‌دهد. کاهش سلول‌ها در سویه باکتری پس از ۵۰ درصد

جدول ۶: میزان MBC محاسبه‌شده برای نمونه‌های نکومایسین آزاد و لیپوزومه در سایر باکتری‌های MRSA

شماره نمونه باکتری	لیپوزوم کنترل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	نکومایسین لیپوزومه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	نکومایسین آزاد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
MRSA1	-	۰/۶ - ۱/۲۵	۲/۵ - ۵
MRSA2	-	۰/۵ - ۱	۲ - ۴
MRSA3	-	۰/۶ - ۱/۵	۲ - ۵
MRSA4	-	۰/۸ - ۱/۵	۲/۵ - ۴/۵
MRSA5	-	۰/۸ - ۱/۲۵	۳ - ۴/۵
MRSA6	-	۰/۵ - ۰/۸	۱/۵ - ۳
MRSA7	-	۰/۸ - ۱/۲۵	۲ - ۴
MRSA8	-	۰/۵ - ۱	۲ - ۳/۵
MRSA9	-	۰/۶ - ۱/۲۵	۳/۵ - ۵



شکل ۶: مقایسه MIC بین نمونه‌های نکومایسین لیپوزومه و نکومایسین آزاد و لیپوزوم خالی به‌عنوان گروه کنترل



شکل ۷: مقایسه MBC بین نمونه‌های ونکومایسین لیپوزومه، ونکومایسین آزاد و لیپوزوم خالی به‌عنوان گروه کنترل

بحث

داروی ایرانی سینادوکسوزوم نیز بر پایه این روش دارورسانی طراحی شده که ترکیبی ضدسرطانی است و برای درمان سرطان تخمدان، سینه، مولتیپل میلوما و کاپوسی سارکومای برای نخستین بار در خاورمیانه در دانشگاه علوم پزشکی مشهد تولید و استفاده شد (۲۴).

یکی از مهم‌ترین داروهایی که فرم لیپوزومال آن بسیار استفاده شده، آمفوتریسین B است که امروزه در درمان بیماری‌های قارچی استفاده می‌شود (۲۵). Tam و همکاران در سال ۲۰۱۷ پلی میکسین را به فرم لیپوزومال تهیه و روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مقاوم به چند دارو بررسی کردند (۲۶). در سال ۲۰۱۸ Pushparaj و همکاران آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سولباکتام، سفنازیدیم، سفپیم، سفالکسین، سفتریاکسون، جنتامایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، پپراسیلین و نیتروفلورادتینین را به‌صورت لیپوزومال تهیه و اثرات ضد میکروبی آنها را بر *S. aureus* / *E. coli* بررسی کردند. یافته‌های آنان ثابت کرد فرم لیپوزومال اثرات مطلوب‌تری را ایجاد کرده است (۲۷).

Gonda و همکاران در سال ۲۰۱۹ سیپروفوکساتین لیپوزومال را تهیه و علیه *Staphylococcus aureus* / *Escherichia coli* بررسی کردند (۲۸). در سال ۲۰۱۸ کبریایی و همکاران فرم لیپوزومال ونکومایسین را تهیه و روی بیوفیلم ناشی از

در اوایل سال ۱۹۶۰ آلف بنگام از کشور انگلستان اعلام کرد که فسفولیپیدها در آب به وزیکول‌های چندجداره تبدیل می‌شوند که هر جداره متشکل از غشای دو لایه‌ای لیپیدی است. این ساختمان در سال ۱۹۶۷ بانگوزوم نام گرفت و در سال ۱۹۶۸ سزا و ویزمن آن را لیپوزوم (ترکیبی از دو واژه یونانی لیپو و سوما به معنای چربی و ساختار) خواندند (۳ و ۲). لیپوزوم کره‌های توخالی متشکل از مواد طبیعی است که مواد محلول در آب را در بخش آبی درونی و مواد محلول در چربی را در غشای دو لایه حمل می‌کند (۵). بر اساس قوانین ترمودینامیک، مولکول‌های آب‌گریز فسفولیپید به شکل منظم در یک کره بسته قرار می‌گیرند تا گروه‌های آب‌گریزشان را روبه‌روی هم داخل این کره و دور از مولکول‌های آب پوشش دهند و در همان حال گروه‌های آب‌دوست در تماس با مولکول‌های آب قرار گیرند (۶).

لیپوزوم‌ها کاربردهای زیادی در پزشکی دارند. مهم‌ترین کاربردهای آنها به‌عنوان حامل‌های دارویی در سیستم‌های نوین دارورسانی است. در سیستم‌های دارورسانی، لیپوزوم‌ها برای رساندن واکسن‌ها، آنزیم‌ها یا داروها (مثل انسولین و داروهای ضدسرطانی) به بدن استفاده می‌شوند (۸). تاکنون ۱۱ دارو با سیستم دارورسانی لیپوزومی تأیید شده‌اند و ۶ دارو نیز در مراحل آزمایش‌های بالینی است (۲۳). اخیراً

همان‌طور که بیان شد، میزان بارگیری ونکومایسین بعد از اولترافیلتراسیون و میزان آنتی‌بیوتیک خروجی از فیلترها به‌وسیله اسپکتروفتومتر در λ_{max} دارو سنجیده شد. با توجه به اینکه داروی ونکومایسین $\lambda_{max}=280$ دارد، طول‌موج جذبی آن با سایر مواد تداخل ایجاد نمی‌کند (λ_{max} لسیترین حدود ۲۲۰ تا ۲۳۰ است). با توجه به اینکه وزن مولکولی ونکومایسین ۱۴۴۹ دالتون است، در فیلترهای ۳ کیلودالتونی استفاده‌شده به دام نخواهد افتاد. Xiaoping Chen نیز بیان کرده است که از فیلترهای ۳ کیلودالتونی برای جداسازی عصاره گیاهی از لیپوزوم استفاده کرده است. در این صورت می‌توان گفت که در اینجا نیز لیپوزوم‌ها نخواهند توانست از این فیلترهای ۳ کیلودالتونی عبور کنند. همان‌طور که در نمودار ۷ نشان داده شده است، با افزایش و کاهش مقدار لیپید استفاده‌شده، بارگیری نیز افزایش و کاهش می‌یابد. در جدول ۳ Anova نشان داده شد مقدار sig کمتر از ۰/۰۵ است که نشان‌دهنده رابطه معنی‌دار بین مقدار کل لیپید و میزان بارگیری است. همچنین عدد R square برابر ۰/۸۲۵ است که نزدیک به یک و نشان‌دهنده رابطه مستقیم بین میزان لیپید و بارگیری است و نشان می‌دهد با افزایش یا کاهش مقدار لیپید، میزان بارگیری نیز افزایش یا کاهش می‌یابد. نمودار ۱۰ و جدول ۴ نیز رابطه مثبت بین لیپید و میزان بارگیری را نشان می‌دهد.

در مطالعه Garg بیان شده است که بیشترین مقدار بارگیری لیپوزوم برای داروی آسکلوفناک در کمترین مقدار لیپوزوم بوده است (۳۲). مطالعه Daraee نشان داد افزایش فسفولیپید باعث افزایش بارگیری لیپوزوم برای داروی ایندیناویر سولفات می‌شود (۳۳). مقایسه بین سنتزها به کمک SPSS نشان می‌دهد بین سایز و میزان بارگیری رابطه‌ای وجود ندارد. همان‌طور که در جدول ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، عدد sig در جدول anova بیشتر از ۰/۰۵

استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند (۲۹). در سال ۲۰۱۹ حاجی احمدی و همکاران فرم لیپوزومال ونکومایسین را تهیه و روی MRSAهای جداشده از بیمار بررسی کردند. نتایج آن‌ها با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (۳۰).

به‌منظور تهیه لیپوزوم از مواد مختلفی مانند کلسترول استفاده می‌شود. کلسترول یکی از اجزای اصلی غشاهای طبیعی است. با توجه به اینکه کلسترول نوعی مولکول آمفی‌پاتیک است، طوری در غشا قرار می‌گیرد که گروه هیدروکسیل آن به سمت محیط آبی و زنجیر آلیفاتیک آن به‌طور موازی با زنجیرهای آسیل در مرکز دو لایه قرار گیرد. با افزایش غلظت کلسترول از یک حد معین، سطح غشا که با زنجیرهای آسیل و استرول اشغال می‌شود، بزرگ‌تر یا مساوی با سطح اشغال‌شده توسط گروه سری فسفوکولین می‌شود، به‌طوری‌که غشاهای فسفاتیدیل کولین که درصد زیادی کلسترول دارند، در مقایسه با لیپوزوم‌هایی که از فسفاتیدیل کولین خالص درست شده‌اند، انحنای موجود در فاز ژلی را نشان نمی‌دهند. افزودن کلسترول به غشاهای فسفاتیدیل کولین بر محل دمای انتقال فاز آن نیز مؤثر است (۳۱).

در لیپوزوم سنتز شده در این مطالعه، با افزودن ۳۳ درصد مولی از کلسترول، دیگر ساختاری تشکیل نمی‌شود. در این تحقیق با نسبت‌های انتخاب‌شده مختلف در نهایت این نتیجه حاصل شد که کاهش مقدار DCP در افزایش میزان پایداری لیپوزوم‌ها مؤثر بوده است. مقدار لیپوزوم‌های با سایزهای بسیار بزرگ در سنتزها با نسبت ۷:۲:۱ از DSPC:DCP:Cholesterol بسیار کم است و اندازه مناسبی دارد. همچنین میزان بارگیری دارو در این دو سنتز به میزان قابل توجهی از مقدار کل دارو به میزان ۶۱/۶ و ۶۶/۵ درصد بوده و پایداری مناسبی تا ۳۰ روز داشته است.

Sujitha و همکاران در سال ۲۰۲۰ هم بیان کرده است لیپوزوم‌ها در هر دو دمای ۲۷ و ۴ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند (۳۷).

در نتیجه آزمایش آنتی‌بیوگرام عملکرد موفقیت‌آمیز ونکومایسین لیپوزوم نشان داده شد و هاله عدم رشد بر پلیت کاملاً نمایان بود. همچنین با توجه عملکرد ضدباکتریایی در آزمون بررسی شده، بین غلظت‌های مختلف نانولیپوزوم ونکومایسین استفاده شده در برابر MRSA و جذب نور UV به دست آمده رابطه قابل مقایسه‌ای وجود دارد. در سویه MRSA، جذب قابل ملاحظه در غلظت‌های کمتر از ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از ونکومایسین آزاد و کمتر از حدود ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر از ونکومایسین لیپوزوم، رشد باکتری‌ها را نشان می‌دهد. کاهش در زنده‌مانی این باکتری با افزایش مقدار نانولیپوزوم ونکومایسین به‌طور قابل ملاحظه‌ای مشهود است. بیشترین میزان کم‌شدن زنده‌مانی هنگامی مشاهده شد که میزان نانولیپوزوم ونکومایسین به ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت ونکومایسین آزاد به ۲ میلی‌گرم بر لیتر رسید و محلول کاملاً شفاف بود. محلول میکروپها در محلول BHI و محلول بدون BHI باکتری به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. همچنین یک گروه لیپوزوم بدون آنتی‌بیوتیک نیز استفاده شد که هیچ‌گونه خاصیت آنتی‌باکتریالی از آن مشاهده نشد.

محل تقاطع نمودار با محور افقی نشان‌دهنده میزان MIC است. مقدار MIC ونکومایسین لیپوزوم برای MRSA به میزان ۰/۶ و برای ونکومایسین آزاد به میزان ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر است. زنده‌مانی MRSA نوعی رفتار لگاریتمی را نشان می‌دهد. کاهش سلول‌ها در سویه باکتری پس از ۵۰ درصد به‌آهستگی صورت می‌گیرد. این نتایج نشان می‌دهد احتمالاً MRSA نسبت به غلظت‌های زیاد نانولیپوزوم ونکومایسین تا حدودی پایدار است و خاصیت

است که نبود رابطه را بین سایز و بارگیری نشان می‌دهد. پراکندگی داده‌های نمودار ۸ رگرسیون نیز این ادعا را تأیید می‌کند. در واقع سایز به زمان و دور هم‌وزن‌نایز کردن وابسته است. هرچند در این بررسی آماری بین سایز و بارگیری رابطه بسیار مستقیمی دیده نمی‌شود، با توجه به داده‌ها و نمودار خطی ۹ شاید بتوان بیان کرد که افزایش سایز باعث افزایش بارگیری و کاهش سایز باعث کاهش بارگیری می‌شود. چنانکه در نمودار رگرسیون ۱۰ نشان داده شده است، در سایزهای حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر میزان بارگیری بیشتر از سایزهای حدود ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر است. در مطالعه Maurya نیز گزارش شده است افزایش سایز با افزایش بارگیری و کاهش سایز با کاهش بارگیری همراه است (۳۴).

پایداری در دمای محیط برای نمونه منتخب (سنتز هشتم) حدود ۱ ماه بوده است. کاهش دما باعث کاهش حرکت براونی لیپوزوم‌ها و در نتیجه به‌هم‌چسبیدن و هم‌جوشی لیپوزوم‌ها شده است که در نهایت باعث رسوب لیپوزوم‌ها می‌شود. در واقع دمای کم برای کاهش اکسیداسیون فسفولیپیدهاست تا از این طریق پایداری آن‌ها افزایش یابد. احتمالاً دمای اتاق، دمای انتقال فاز ژل به فاز بلور مایع باشد؛ بدین معنی که کاهش دمای اتاق می‌تواند باعث تغییر فاز و در نتیجه ناپایداری و هم‌جوشی بیشتر لیپوزوم‌ها شود. به‌طور کلی، تغییر دما باعث ناپایداری لیپوزوم‌ها شده است.

در مطالعه Muller و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز گزارش شده است سرد کردن نمونه‌ها ضروری نیست و سایز و توزیع سایز بدون سرد کردن بهتر است (۳۵). در مطالعه Mandan و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش شد پایداری نمونه مورد نظر در دمای 30 ± 2 و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد، در مدت ۶۰ روز از نظر سایز و میزان بارگیری دارو تغییر زیادی نکرده است (۳۶). همچنین مطالعه

از DLS در حدود ۱۵۴ نانومتر و قطر نانوذره با استفاده از SEM، ۱۰۰ نانومتر است. اختلاف بین نتایج DLS و SEM به دلیل این است که DLS شعاع هیدرودینامیک را در نظر می‌گیرد یا شعاع نانوذره به‌علاوه شعاع آبی را که اطراف نانوذره قرار دارد. برای همین قطر نانوذره در DLS بیشتر از دستگاه SEM است. به‌طور کلی نتایج به‌دست‌آمده از شکل و اندازه نانوذرات نشان‌دهنده این است که نانوذره ما به‌صورت یک کلئوئید پایدار بود و نانوذره سنتز شده هموزن و یکدست است. از میان ۹ سنتز انجام‌شده، سنتز هشتم انتخاب شد که بهترین بارگذاری، کوچک‌ترین اندازه و بیشترین پایداری را داشت و آزمایش‌های زیستی روی آن انجام شد.

موارد یادشده با میزان لیپید کلی استفاده‌شده و نیز نسبت‌های آن‌ها به‌خصوص کلسترول بستگی دارد. در انتها با بررسی و مقایسه و نکومایسین به حالت لیپوزوم و آزاد، عملکرد مناسب و نکومایسین لیپوزوم به‌خوبی ابتدا با آزمون‌های دیسک دیفیوژن و در ادامه با آزمون‌های سنجش حداقل غلظت بازدارنده و حداقل غلظت کشندگی نشان داده شد. به‌طوری‌که MIC برای لیپوزوم آزاد و لیپوزوم به ترتیب در حدود ۲/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد. سپس آزمون MBC با انتقال محیط‌هایی از لوله‌های MIC در غلظت محاسبه‌شده و غلظت‌های بیشتر نشان داد کشندگی و نکومایسین آزاد و لیپوزوم به ترتیب به میزان ۲/۵ تا ۵ و ۰/۶ تا ۱/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر است و می‌توان ادعا داشت که در شرایط آزمایشگاهی که این پژوهش انجام شده است، نتایج مناسبی از فرم لیپوزومال داروی و نکومایسین علیه باکتری‌های MRSA گرفته شد. هرچند نیاز به آزمایش‌های بالینی و پژوهش‌های عملکردی این فرم دارو و پاسخ میزان لازم است، امید می‌رود هرچند کوچک را برای درمان راحت‌تر با عوارض کمتر ایجاد کرده است.

باکتری‌کشی در غلظت‌های کمتر نسبت به مقادیر زیاد آن، بیشتر مشاهده می‌شود. با توجه به آزمون‌های انجام‌شده هر دو مقادیر MIC و MBC به‌دست‌آمده برای و نکومایسین لیپوزوم ۲ تا ۴ برابر کمتر از همان مقادیر برای و نکومایسین آزاد محاسبه شده است.

حداقل غلظت کشندگی طبیعتاً از MIC کمتر بوده و مقادیری بین ۰/۶ تا ۱/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر برای و نکومایسین لیپوزوم و ۲/۵ تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر برای و نکومایسین آزاد نشان داده شده است. در سال ۲۰۱۸ کبریاپی و همکاران در یک گروه تحقیقاتی و Serri و همکاران در گروه تحقیقاتی دیگری فرم لیپوزومال و نکومایسین را تهیه و روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند (۲۹، ۳۸). همین‌طور در سال ۲۰۱۹ حاجی احمدی و همکاران نیز فرم لیپوزومال و نکومایسین را تهیه و روی MRSA بررسی کردند (۳۰). نتایج هر سه تحقیق با نتایج این پژوهش همسو بود و همگی به نتایج مناسب‌تر فرم لیپوزومال نسبت به فرم معمول و نکومایسین اذعان داشتند؛ اما برای رسیدن به هدف نهایی تولید داروی و نکومایسین لیپوزومال به انجام آزمون‌های حیوانی و تحقیقات بیشتر نیاز است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه به معرفی یک لیپوزوم حاوی آنتی‌بیوتیک و نکومایسین و بررسی خاصیت ضدباکتریایی آن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین پرداخته است. به‌طور خلاصه، نانولیپوزوم حاوی و نکومایسین با روش ساده تهیه و فعالیت ضدباکتری آن روی MRSA بررسی شد. از اطلاعات به‌دست‌آمده می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که داده‌های DLS می‌تواند به‌خوبی داده‌های میکروسکوپی الکترونی SEM را حمایت کند. قطر به‌دست‌آمده با استفاده

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز انجام شده است.

تضاد منافع

یافته‌های این پژوهش با هیچ مرکزی تضاد منافع ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با رعایت کامل ملاحظات اخلاقی انجام شده است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز انجام شده است. بدین‌وسیله از زحمات تمامی عزیزان تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

- Patel V. Liposome: a novel carrier for targeting drug delivery system. *Asian J Pharm Res Dev.* 2020; 8(4):67-76.
- Eroğlu İ, İbrahim M. Liposome-ligand conjugates: a review on the current state of art. *J Drug Target.* 2020; 28(3):225-44.
- Singh LD, Ganju K, Rajpoot R. Review on liposome as novel approach for cancer therapy. *Asian J Pharm Res Dev.* 2020; 8(3):122-9.
- Chauhan SB, Gupta V. Recent advances in liposome. *Res J Pharm Technol.* 2020; 13(4):2053-6.
- Patel V. Liposome: a novel carrier for targeting drug delivery system. *Asian J Pharm Res Dev.* 2020; 8(4):67-76.
- Singh S, Sharma N, Grover R, Grewal IK. Liposome-based drug delivery system for cancer chemotherapeutics. *Plant Arch.* 2020; 20(1):3305-15.
- Choudhury A, Sonowal K, Laskar RE, Deka D, Dey BK. Liposome: a carrier for effective drug delivery. *J Appl Pharm Res.* 2020; 8(1):22-8.
- Catania R, Maguire O, Moore C, Falcone FH, Chan W, Mantovani G, et al. Functionalised liposomal formulations for delivery of antibiotic agents. *Access Microbiol.* 2019; 1(1A):788.
- Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2017; 9(1):e1416.
- Priyanka R, Bhattacharyya S. A review on promising antibiotic therapy by novel delivery systems. *Asian J Pharm Clin Res.* 2018; 11(5):18-24.
- Dezfulian A, Aslani MM, Oskoui M, Farrokh P, Azimirad M, Dabiri H, et al. Identification and characterization of a high vancomycin-resistant staphylococcus aureus harboring VanA gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15(2):803-6.
- Luque Y, Louis K, Jouanneau C, Placier S, Esteve E, Bazin D, et al. Vancomycin-associated cast nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28(6):1723-8.
- Erickson LL, Nelson T, Oakes JM. Hospital policies related to transmission of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). *Infect Cont Hosp Epidemiol.* 2020; 41(S1):s252-3.
- Mairi A, Touati A, Lavigne JP. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST80 Clone: a systematic review. *Toxins.* 2020; 12(2):119.
- Galar A, Weil AA, Dudzinski DM, Muñoz P, Siedner MJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic valve endocarditis: pathophysiology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(2):e00041-18.
- Jani M, Sengupta S, Hu K, Azad RK. Deciphering pathogenicity and antibiotic resistance islands in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genomes. *Open Biol.* 2017; 7(12):170094.
- Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):18033.
- Kalhature RS, Suleman N, Mocktar C, Seedat N, Govender T. Nanoengineered drug delivery systems for enhancing antibiotic therapy. *J Pharm Sci.* 2015; 104(3):872-905.
- Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(2):145-60.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8(1):102.
- Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the

- properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). Trop J Pharm Res. 2013; 12(2):265-73.
22. Trucillo P. Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach. Processes. 2021; 9(3):470.
 23. Zylberberg C, Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. Drug Deliv. 2016; 23(9):3319-29.
 24. Wibroe PP, Ahmadvand D, Oghabian MA, Yaghmur A, Moghimi SM. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. J Control Release. 2016; 221:1-8.
 25. Stone NR, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. Drugs. 2016; 76(4):485-500.
 26. Tam V, Chow D, He J. Liposomal formulations of polymyxin and uses thereof. Washington, D.C: United States Patent US; 2017.
 27. Pushparaj Selvadoss P, Nellore J, Balaraman Ravindran M, Sekar U, Tippabathani J. Enhancement of antimicrobial activity by liposomal oleic acid-loaded antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018; 46(2):268-73.
 28. Gonda I, Blanchard J, Cipolla DC, Bermudez LE. Liposomal ciprofloxacin formulations with activity against non-tuberculous mycobacteria. Washington, D.C: United States Patent US; 2019.
 29. Kebriaei R, Bhise K, Sau S, Rice S, Stamper K, Iyer A, et al. Liposomal vancomycin and cefazolin combinations for *S. aureus* biofilms. Open Forum Infect Dis. 2018; 5(Suppl 1):S713.
 30. Hajiahmadi F, Alikhani MY, Shariatifar H, Arabestani MR, Ahmadvand D. The bactericidal effect of liposomal vancomycin as a topical combating system against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin wound infection in mice. Med J Islam Republ Iran. 2019; 33(1):941-7.
 31. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr Drug Deliv. 2007; 4(4):297-305.
 32. Garg T, K Goyal A. Liposomes: targeted and controlled delivery system. Drug Deliv Lett. 2014; 4(1):62-71.
 33. Luo D, Li N, Carter KA, Lin C, Geng J, Shao S, et al. Rapid light-triggered drug release in liposomes containing small amounts of unsaturated and porphyrin-phospholipids. Small. 2016; 12(22):3039-47.
 34. Marqués-Gallego P, de Kroon AI. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. Biomed Res Int. 2014; 2014:129458.
 35. Müller M, Mackeben S, Müller-Goymann CC. Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. Int J Pharm. 2004; 274(1-2):139-48.
 36. Mandan S, Chavan M, Bhadane Y, Kalal C. Nanosponges: a new drug delivery system. J Drug Deliv Ther. 2018; 8(6-A):141-3.
 37. Sujitha S, Dinesh P, Rasool M. Berberine encapsulated PEG-coated liposomes attenuate Wnt1/ β -catenin signaling in rheumatoid arthritis via miR-23a activation. Eur J Pharm Biopharm. 2020; 149:170-91.
 38. Serri A, Mahboubi A, Zarghi A, Moghimi H. Investigating the antimicrobial efficacy of liposomal vancomycin in gram-positive and gram-negative bacteria-a preliminary mechanistic study. Iran J Pharm Sci. 2018; 14(3):13-24.



Original Article

Design and Synthesis of Liposomal Vancomycin and Evaluation of its Antibacterial Effects on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Fatemeh Yaghobi Nahad¹, Behin Omid^{2*}, Fatemeh Davoudi²¹ Msc in Microbial Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran² Assistance Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 05 December 2020

Accepted: 30 January 2021

Abstract

Introduction: Liposomes, as nanocarriers, have developed advanced systems for transporting biological molecules, such as vaccine adjuvants, anti-cancer drugs, antifungals, and painkillers. In this study, liposomal vancomycin was prepared and its antimicrobial effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as one of the most important nosocomial infections, was investigated.

Materials and Methods: Liposomes were prepared using hydration and dehydration methods. Their surface morphology was measured using a scanning electron microscope (SEM), medium size of DLS (Dynamic Light Scattering), zeta potential, liposome stability, and drug loading rate. Antimicrobial effects and minimum inhibitory concentration (MIC) were performed using disc diffusion and microdilution methods, respectively, and the results were compared with the original form of the drug.

Results: Liposomal vancomycin was performed in several syntheses with DSPC:DCP: Cholesterol ratio, which showed the best result with a ratio of 7:2:1. Its size was reported with 154 nm in DLS and 100 nm in SEM. The drug loading rate was 61.6% and liposome stability was 30 days. The mean diameter of non-growth halos in the samples was 19.44 mm in free form and 22.7 mm in liposomal form. The MIC of free form was 1.2 mg/ml and liposomal form was 4.27 mg/ml.

Conclusion: The results indicated that the liposomal vancomycin form was stable for up to 30 days and its antimicrobial effects showed better results than the free vancomycin form against the MRSA isolated from the hospital.

Keywords: Drug delivery, Liposomal vancomycin, Liposome, MRSA