

مقایسه اثر ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد و لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا*

محسن میرزایی^۱، امیر قریب^۱، پرویز اولیاء^{۲*}

^۱ گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

^۲ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

نویسنده رابط: پرویز اولیاء، تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدا... زاده، پلاک ۲۹، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی.

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲ powlia@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۸/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۸

چکیده:

زمینه و اهداف: *پسودوموناس آئروژینوزا* از عوامل مهم بیماریزای فرصت طلب است که با داشتن فاکتورهای بیماریزایی متعدد قادر است طیف وسیعی از عفونت ها را ایجاد کند. سیستم های حامل دارویی موجب کاهش سمیت داروها شده و شاخص های درمانی را به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می دهند. استفاده از لیپوزوم ها برای این منظور بسیار مفید است. لیپوزوم ها گویچه های کلوئیدی هستند که قطر آنها از کمتر از چند نانومتر تا چندین میکرومتر متغیر است. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با فرم آزاد دارو بر سویه *پسودوموناس آئروژینوزا* بود. روش بررسی: در این مطالعه، برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) آمیکاسین در فرم لیپوزومی و آزاد بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، از روش رقت در برات مطابق دستورالعمل (CLSI) Clinical and laboratory standards institute استفاده شد. برای تهیه لیپوزوم ها از روش سونیکاسیون استفاده شد. تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت معادل MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد مورد بررسی قرار گرفت و با تغییرات تعداد باکتری ها در حضور غلظت های مختلف آمیکاسین در فرم آزاد، مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که آمیکاسین در فرم لیپوزومی بر *پسودوموناس آئروژینوزا* اثر ضد میکروبی دارد و مقدار MIC آن معادل ۴ $\mu\text{g/ml}$ و مقدار MIC در فرم آزاد ۲ $\mu\text{g/ml}$ بدست آمد. مقایسه تغییرات کاهش تعداد باکتری ها در حضور آمیکاسین در فرم لیپوزومی با آمیکاسین در فرم آزاد نشان داد که بعد از گذشت ۸ ساعت آمیکاسین در فرم لیپوزومی با غلظت ۴ $\mu\text{g/ml}$ دارای اثری برابر در مواجهه با غلظت ۶ $\mu\text{g/ml}$ آمیکاسین به فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت است.

نتیجه گیری: باتوجه به مقاومت بالای *پسودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک های متداول، احتمال دارد که با مطالعات بیشتر بتوان از سیستم های حامل دارویی، از جمله لیپوزوم های حاوی آمیکاسین به عنوان دارو استفاده کرد.

کلید واژها: *پسودوموناس آئروژینوزا*، لیپوزوم، آمیکاسین

مقدمه :

هیدروکسید، ۲- پروپانول، اسید بوریک، ۲- مرکاپتو اتانل، متیل کلراید، کلروفرم، اتانل و اورتوفتال دی آلدئید از شرکت مرک-آلمان تهیه شدند. محلول آنتی بیوتیکی در آب مقطر استریل تهیه می‌شد و به صورت تازه در روز مورد استفاده، تهیه می‌گردید.

روش تهیه لیپوزوم ها :

برای تهیه لیپوزوم های حاوی آمیکاسین مقادیر مشخصی از لسیتین و کلسترول به یک بالن ته گرد منتقل شد و توسط کلرفرم به صورت کامل حل می‌شد. سپس به دستگاه روتار متصل شد و با استفاده از دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و تحت فشار کم طی مدت کوتاهی کلرفرم حذف می‌گردید و لایه نازکی از چربی بر دیواره داخلی بالن ایجاد می‌شد. به منظور هیدراته کردن فیلم حاصله و تشکیل لیپوزوم ها، مقدار ۶۰ میلی گرم پودر آمیکاسین در ۶ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به آرامی به فیلم حاصل افزوده شد. سپس مجدداً بالن به دستگاه روتار متصل شد و در دمای اتاق بدون خلاء هیدراته شدن فیلم صورت گرفت. برای جدا سازی داروی محصور نشده از سوسپانسیون لیپوزومی از روش سانتریفوژ استفاده شد. برای این منظور سوسپانسیون لیپوزومی ۳ بار و هر بار ۴۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰g سانتریفوژ و بعد از هر بار سانتریفوژ مایع رویی جدا شده و رسوب لیپوزومی دوباره با آب مقطر به حالت سوسپانسیون در می‌آمد. رسوب نهایی با استفاده از ۶ میلی لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد و به منظور تعیین درصد محصور سازی و روند آزاد سازی مورد بررسی قرار گرفت (۷).

تعیین درصد محصور سازی :

برای این منظور پس از جداسازی داروی محصور نشده مقدار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون لیپوزومی به یک مزور انتقال یافت. برای شکستن غشاء لیپوزومی و آزاد سازی آمیکاسین محصور شده مقدار ۴ میلی لیتر تریتون X-100 (۱۰٪) V/V داخل مزور ریخته شد و بعد با تکان دادن شدید و قرار دادن آن در حمام آب گرم ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد، انحلال غشاء لیپوزومی صورت پذیرفت. حجم محلول حاصل با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد، سپس بعد از انجام مراحل مشتق سازی، میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق به دستگاه HPLC تزریق شد و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد آمیکاسین و تعیین غلظت آن، کارایی محصور سازی با استفاده از رابطه ذی ربط محاسبه گردید (۸).

پسودوموناس آنروژینوزا یک باکتری بیماریزای مهم است که به خصوص با عفونت هایی از قبیل پنومونی، عفونت دستگاه ادراری و عفونت زخم سوختگی در ارتباط می‌باشد. این باکتری دارای مکانیسم های متفاوت مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها از قبیل غیر فعال سازی آنزیماتیک دارو، تغییر در جایگاه هدف دارو و سیستم های برون ریز (efflux) آنتی بیوتیک ها است (۱ و ۲). با این حال نفوذ پذیری کم غشاء خارجی این باکتری مهم ترین عامل در ایجاد مقاومت دارویی محسوب می‌شود (۳). پسودوموناس آنروژینوزا به صورت ذاتی نسبت به بسیاری از عوامل ضد میکروبی دارای مقاومت می‌باشد و ایجاد سویه های مقاوم و اغلب بروز مقاومت های چندگانه دارویی (Multidrug resistance) سبب شده است که درمان عفونت های ناشی از این باکتری در بیشتر موارد، با شکست مواجه شود (۳). یکی از روش های جدید دارو درمانی استفاده از دارو رسانی (Drug delivery) با استفاده از لیپوزوم ها می‌باشد. حاملین دارو می‌توانند دارو را در خود محصور نموده و از این طریق از سمیت آن درون بدن کاسته می‌شود. همچنین حاملین دارویی باعث می‌شوند که نیمه عمر دارو در بدن بیشتر شود (Long - circulation) و از این طریق موجب می‌شوند که به منظور درمان بیماری دوز کلی کمتری از دارو نیاز باشد. این امر نیز به کاهش اثر جانبی دارو و اثرات تخریبی آن روی بافت های مختلف منجر می‌شود (۵ و ۴). هدف از انجام این مطالعه، مقایسه آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی لیپوزوم های حاوی آمیکاسین در مقایسه با آمیکاسین در فرم آزاد بر پسودوموناس آنروژینوزا بود.

مواد و روش ها :

در این مطالعه از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد پسودوموناس آنروژینوزا (ATCC 27853) استفاده شد. برای این منظور از کشت باکتری بر روی محیط مولر - هیتون آگار، سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند در نرمال سالین ۰/۸۵ درصد تهیه شد. در این شرایط تعداد باکتری ها حدود $10^8 \times 1/5$ CFU/ml می‌باشد. از این سوسپانسیون در مراحل بعدی آزمایش ها استفاده می‌شد (۶). پودر آنتی بیوتیک آمیکاسین با پتنتی معادل ۰/۹۰۷ میلی گرم و تریتون X-100 از شرکت سیگما؛ لسیتین و کلسترول از شرکت Lipoid آلمان تهیه شدند. متانل، کربنات سدیم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم

برابر باکتری پseudomonas آئروژینوزا نداشتند در جدول شماره ۱ نتایج حاصل از آزمایش های MIC آورده شده است .

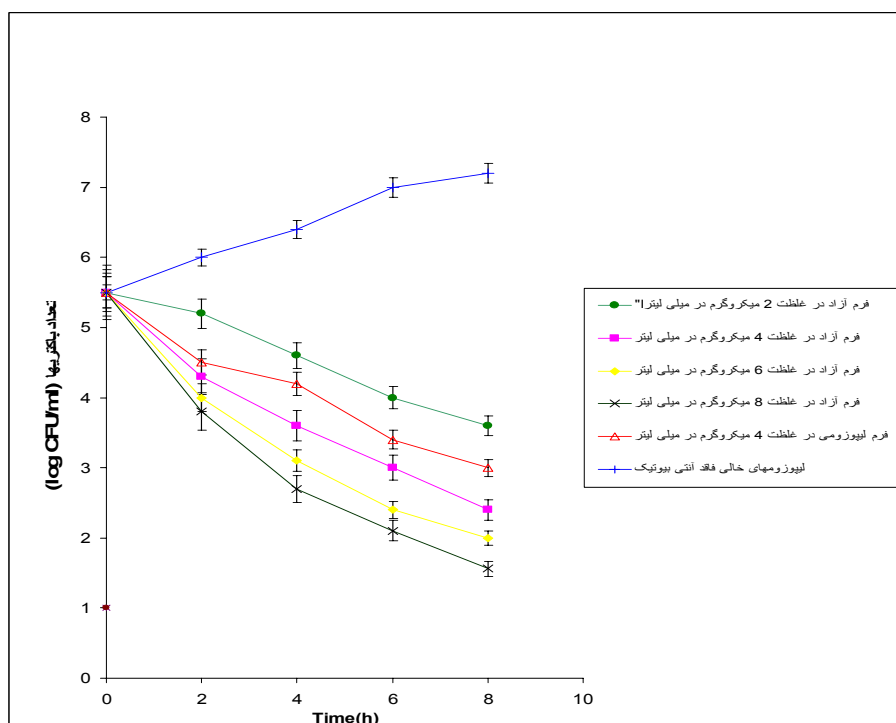
همچنین در بررسی اثر لیپوزوم های خالی روی رشد باکتری ها مشخص شد، که لیپوزوم های خالی هیچ فعالیت ضد میکروبی در

جدول ۱: اثر ضد میکروبی آمیکاسین در فرمهای آزاد و لیپوزومی روی پseudomonas آئروژینوزا در برون تن

حداقل غلظت مهار کنندگی دارو			
باکتری	آمیکاسین در فرم آزاد	آمیکاسین در فرم لیپوزومی	آمیکاسین آزاد + لیپوزومهای خالی
پseudomonas آئروژینوزا	۲ μg/ml	۴ μg/ml	۲ μg/ml

کاهش بیشتری در تعداد باکتری ها نسبت به نمونه آمیکاسین به فرم آزاد می شوند، به طوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت با غلظت MIC فرم لیپوزومی (۴ μg/ml) بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری ها در غلظت ۶ μg/ml آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می گردد.

نتایج حاصل از آزمایش سینتیک مرگ در نمودار شماره ۱ آورده شده است. در این نمودار تغییرات تعداد باکتری ها در زمان های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت مجاورت با غلظت MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی و غلظت های مختلف آمیکاسین آزاد و لیپوزوم فاقد آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده این نکته بود که لیپوزوم های حاوی آمیکاسین با افزایش زمان باعث



نمودار ۱: مقایسه اثر آمیکاسین در فرم آزاد در غلظت های مختلف و آمیکاسین در فرم لیپوزومی با غلظت برابر با MIC در تغییر تعداد باکتری ها در زمان های مختلف

بحث:

مشکل عمده در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، مقاومت بسیار زیاد آن در برابر مواد ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها است. معمولاً این مقاومت ناشی از مقاومت ذاتی و عدم نفوذپذیری مواد ضد میکروبی به درون باکتری است. پیدایش سویه‌های دارای مقاومت چندگانه، این مشکل را چند برابر کرده است و باعث ایجاد معضل بسیار زیادی شده است (۳). این حالت خصوصاً در برخی بیماری‌ها از قبیل فیروز سیستمیک و مواردی مانند سوختگی‌ها به خوبی مشاهده می‌شود (۱۱ و ۱). با توجه به رویکرد جدیدی که نسبت به استفاده از سیستم‌های حامل دارویی ایجاد شده، از این سیستم‌ها ممکن است در درمان عفونت‌ها استفاده شود. در این راستا *پسودوموناس آئروژینوزا* همواره یکی از باکتری‌های مورد بررسی است. در مطالعه حاضر به بررسی اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین و مقایسه آن با اثر آمیکاسین به فرم آزاد پرداخته شده است. تا به حال مطالعات فراوانی روی لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و اثرات ضد میکروبی آنها صورت گرفته است. از جمله آنها می‌توان به مطالعه Omri اشاره کرد. در این مطالعه اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین بر باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان داده است که MIC دارو در فرم لیپوزومی آمیکاسین نسبت به فرم آزاد افزایش نشان داد. مقدار MIC نیز که به دست آورده است برابر ۸ میلی‌گرم در لیتر برای باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* بود (۱۲). همانطور که ملاحظه می‌شود در این مطالعه مانند مطالعه حاضر، مقدار MIC تعیین شده است، اما تفاوت آن در دو قسمت اصلی است. اولاً در این تحقیق مقادیر فسفولیپیدهای بکار برده شده با مقادیر فسفولیپیدهای ما متفاوت بوده است. همانطور که مشاهده می‌شود ما توانسته ایم با تغییراتی که در مقادیر و ترکیب فسفولیپیدها انجام داده ایم میزان MIC را نسبت به مطالعه ایشان به صورت محسوسی کاهش دهیم و این نوید وجود دارد که با مطالعات بیشتر روی نوع و مقادیر فسفولیپیدها بتوان میزان MIC را از فرم آزاد نیز کمتر نمود. ثانیاً روش تعیین MIC در مطالعه Omri، رقت در آگار بوده است، در صورتی که در روش حاضر، تهیه رقت در برات اصلاح شده بکار رفته است. اشکال روش تهیه رقت در آگار در خصوص کار با لیپوزوم‌ها در این نکته است که جامد بودن محیط کشت مانع از انتشار و ادغام موثر لیپوزوم‌ها با جداره باکتری‌ها می‌شود. مطالعه دیگر مربوط به Mugabe و همکاران است. در این مطالعه اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین، توبرامیسین و

جتنامیسین به روش تهیه رقت در برات روی رشد *پسودوموناس آئروژینوزا* در زمان‌های مختلف بررسی شده است. ایشان مشخص کرده‌اند که میزان MIC آمیکاسین در فرم لیپوزومی در مقایسه با فرم آزاد کمتر بوده است. همانطور که ملاحظه می‌شود، در این مطالعه نیز اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین تأیید شده است (۱۳). با انجام همین آزمایش با غلظت‌های مختلف آمیکاسین آزاد و بررسی تغییرات تعداد باکتری‌ها در زمان‌های مختلف و مقایسه نتایج آن با آزمایش قبل، اطلاعاتی حاصل می‌آید که می‌توان تا حدودی مقایسه کرد که میزان عملکرد لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین، اثری برابر با چه مقدار آنتی‌بیوتیک را دارد. به طوری که نسبت کاهش تعداد باکتری در مجاورت باغلظت MIC، $2 \mu\text{g/ml}$ فرم لیپوزومی بعد از گذشت ۸ ساعت، در حدود نسبت کاهش تعداد باکتری‌ها در غلظت $6 \mu\text{g/ml}$ آمیکاسین در فرم آزاد بعد از گذشت ۴ ساعت می‌گردد. در مطالعه دیگری که توسط Omri و همکاران روی اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مختلف انجام گرفته است، نشان داده شده که مقدار MIC لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین و آمیکاسین در فرم آزاد به ترتیب برابر ۱۶ و ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. تفاوت مطالعه اخیر با مطالعه ما نوع و میزان فسفولیپیدهای بکار رفته است. بنحوی که در بررسی ما میزان MIC بدست آمده برای فرم لیپوزومی ۱ برابر پایین‌تر از مطالعه ایشان است (۱۴). با توجه به تأثیر فرم آزاد و لیپوزومی آمیکاسین در غلظت MIC مشاهده می‌شود که اثر ضد میکروبی فرم لیپوزومی به کندی و دیرتر از فرم آزاد صورت می‌گیرد. همچنین در مقایسه نتایج حاصل از آزمایشات MIC حداقل غلظت مهارکنندگی فرم آزاد در مقایسه با فرم لیپوزومی افزایش می‌یابد. این امر اینگونه توجیه می‌شود که کلیه داروی محصور در لیپوزوم با باکتری وارد واکنش نمی‌شوند. در عین حال لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین توزیع متفاوتی نسبت به فرم آزاد در بدن داشته لذا از تجمع دارو در ارگان‌هایی نظیر گوش و کلیه جلوگیری نموده و عوارض جانبی کاهش می‌یابد (۱۲).

نتیجه گیری:

هرچند اثر ضد میکروبی لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین بر *پسودوموناس* دیده شد، اما تکرار آزمایش با روش‌ها و مواد مختلف لازم می‌باشد. همچنین اثر خوب لیپوزوم‌های حاوی آمیکاسین

فرمولاسیون های آنتی بیوتیک های مختلف به فرم لیپوزومی بر پseudomonas آئروژینوزا و سایر میکروارگانیزم ها، بررسی اثرات سمی آن در کشت سلولی و اثرات درمانی آن در مدل های حیوانی، توصیه می شود.

می تواند این نوید را بدهد که دریچه های جدید به سمت مبارزه با این میکروارگانیزم فرصت طلب برای ما باز شده است. البته برای رسیدن به هدف نهایی مراحل متعدد دیگری باقی مانده است که در تحقیقات بعدی باید مد نظر قرار گیرد. بررسی اثر

فهرست مراجع:

- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 93-99.
- Hauser AR, Sriram P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the conundrum of drug resistance. *Postgrad. Med* 2005; 117: 41-48.
- Hill DBR, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005. 43: 5085-90.
- Moghimi, SM, Hunter AC, Murrug JC. Long – circulating and target – specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacol.Rev* 2001; 53: 283-318.
- Deamer W, Uster S, 1993. Liposome preparation: Methods and mechanisms in: "Liposomes", edited by Marc, J. Ostro. Marcksl Dekker, Inc. pp: 510-27.
- Baron EJ and Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*. 11th ed. Mosby company, New York, 171- 86.
- Ravaoarino M, Toma E, Agbaba O, Morisset R. Efficient entrapment of amikacin and teicoplanin in liposomes. *J Drugs Targeting* 1993; 26: 239-250.
- Poyner EA, Alpar HO, and Brown MRW. Preparation and the effects of free and liposomal tobramycin on siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 43-52.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2003. Approved standard-6th ed. M7-A6. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa.
- Beauillac C, Sachetelli S, Lagace J. In vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentration of liposome-encapsulated antibiotic agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 35-41.
- Omri, A., and M. Ravaoarino. 1996. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 170-176.
- Omri, A, Ravaoarino. Comparison of the bactericidal action of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 42: 170-6.
- Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. *Int J Pharma* 2006; 307: 244-50.
- Omri, A, Ravaoarino, M. Preparation properties and the effects of amikacin, netilmicin and tobramycin in free and liposomal formulation on agents gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob Agent* 1996; 7: 9-14.