

تهیه انواع فرمولاسیونهای لیپوزومی پیراکتام و بررسی اثر ضد میکروبی بر

*Pseudomonas aeruginosa*حمیده میرزاخانلو^۱، رابعه خوشنویس زاده^{۲*} و شهره زارع کاریزی^۳^۱ ایران، ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست فناوری میکروبی^۲ ایران، ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک^۳ ایران، ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶

چکیده

Pseudomonas aeruginosa از باکترهای متداول در عفونت‌های بیمارستانی بوده که با مکانیسم‌های مختلفی در برابر انواع آنتی‌بیوتیکها مقاوم می‌شود. امروزه یکی از راهکارهای افزایش راندمان درمان، بهره‌گیری از سامانه‌های دارورسانی مثل لیپوزومهاست. در این مطالعه پیراکتام، آنتی‌بیوتیک مؤثر بر *P.aeruginosa* در انواع فرمولاسیون لیپوزومی محصور شده و کارایی آنها با سنجش MIC مورد ارزیابی قرار گرفته است. انواع لیپوزومهای خنثی، کاتیونی و آنیونی از طریق تبخیر فاز حلال تهیه و خواص بیوفیزیکی آنها شامل شکل، اندازه و بار به ترتیب با کمک میکروسکوپ الکترونی، تکنیک DLS و زتا سایزر ارزیابی شد. اثر ضد میکروبی فرمولاسیونهای لیپوزومی و محلول دارویی بر روی دو جدایه بالینی و یک سویه استاندارد (27853) *P.aeruginosa* به روش رقیق سازی سریالی مورد بررسی قرار گرفت و با کمک تکنیک HPLC میزان انکپسولاسیون فرمولاسیونهای مختلف لیپوزومی به دست آمد. میکروسکوپ الکترونی لیپوزومهای کروی شکلی را نمایش داد که نوع خنثی، کاتیونی و آنیونی آن به ترتیب دارای ابعاد ۱۳۳/۸، ۱۱۷/۷ و ۸۳/۸۱ نانومتر و بار ۶/۵۶-، ۲۶/۹ و ۲۳/۵- میلی‌ولت بوده است. تکنیک HPLC میزان انکپسولاسیون لیپوزوم خنثی، کاتیونی و آنیونی را به ترتیب ۲۶/۵، ۳۱/۸ و ۳۷/۶ درصد ارزیابی کرد. نتایج کمترین غلظت مهارکنندگی بر روی سویه استاندارد و دو جدایه ۶۲ و ۶۰ برای داروی آزاد ۴۰، ۸، ۸، لیپوزوم خنثی ۴، ۳۲، ۱۶، لیپوزوم کاتیونی ۴، ۸، ۳۲ و لیپوزوم آنیونی ۱، ۲ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. استفاده از تکنیک تبخیر فاز حلال، امکان تشکیل ذرات لیپوزومی را فراهم کرد که دارای ابعاد کوچک و درصد انکپسولاسیون مناسب بود. مقایسه نتایج میکروبی فرمولاسیونهای مختلف با داروی آزاد نشان داد لیپوزوم آنیونی پیراکتام با چهار برابر کاهش MIC نسبت به داروی آزاد، بهترین فرمولاسیون برای مهار رشد سویه‌های سودوموناسی مورد مطالعه در این تحقیق بوده است.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، پیراکتام، *P.aeruginosa*، اثر ضد میکروبی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۲۶۱۳۵۲، آدرس پست الکترونیکی: khoshneviszade@iauvaramin.ac.ir

مقدمه

ویژه مشاهده می‌شود (۱۱).
مطالعات آماری درباره شیوع عفونت‌های بیمارستانی این باکتری نشان داد در سال ۱۳۸۹ در بیمارستان الزهرا اصفهان عامل ۷ درصد عفونت‌های پوستی (۳) و در سال

باکتری گرم منفی *P.aeruginosa* یکی از عوامل مؤثر در عفونت‌های پنومونی، دستگاه ادراری و زخم‌های سوختگی است (۵). این باکتری عامل یک دهم عفونت‌های بیمارستانی بوده و بیشتر در بخش‌های سوختگی، جراحی و مراقبت‌های

عفونتهای درون سلولی کارآمد است همچنین لیپوزوم قادر به عبور از بیوفیلیم باکتریها بوده و برای از بین بردن عفونتهای بیوفیلیمی مناسب است (۳۴). خواص لیپوزومها در کاهش MIC، دارورسانی مؤثر به پوست و بخشهای تحتانی ریه باعث شکل‌گیری مطالعه حاضر شد تا امکان تهیه و اثر انواع فرمولاسیونهای لیپوزومی پیراکتام بر *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

تهیه فرمولاسیون های لیپوزومی: برای تهیه هر سه نوع فرمولاسیون خنثی، آنیونی و کاتیونی لیپوزوم حاوی پیراکتام از روش تبخیر فاز حلال استفاده شد (۳۷). همه مواد محلول در چربی با کمک کلروفرم در بالون ۲۵۰ میلی لیتری حل شده و به دستگاه روتاری اپرویتور (IKA آلمان) متصل شد. این دستگاه با ایجاد خلاء در دمای ۴۰ درجه، کلروفرم را حذف کرده و فیلم خشک فسفولیپیدی بر روی دیواره بالون ته گرد به وجود آمد. در مرحله بعدی، با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر محلول پیراکتام (شرکت دانا تبریز) به غلظت ۲۲/۶ میلی گرم بر میلی لیتر هیدراتاسیون فیلم خشک فسفولیپیدی انجام شد این مرحله به آهستگی و همراه با ورتکس بود تا محلول همگنی از لیپوزوم ایجاد شود. مواد محلول در چربی در لیپوزومهای مختلف به شرح زیر است:

لیپوزوم خنثی: در تهیه لیپوزوم خنثی ۳۳/۲ میلی مولار فسفولیپید ۹۰G (حاوی ۹۰ درصد فسفاتیدیل کولین از شرکت لیپوید) و ۲۰ میلی مولار کلسترول (شرکت مرک) بکار رفت.

لیپوزومی کاتیونی: ۳۳/۲ میلی مولار فسفولیپید ۹۰G به همراه ۲۰ میلی مولار کلسترول و ۱۲ میلی مولار استتاریل آمین (شرکت مرک) در کلروفرم حل شد.

لیپوزومی آنیونی: ۳۳/۲ میلی مولار فسفولیپید ۹۰G به

۱۳۹۵ در بیمارستان توحید سنندج عامل ۲۴ درصد عفونتهای بخش سوختگی *P.aeruginosa* بوده است (۷) و در یک مطالعه تحلیلی بسیط بین سالهای ۱۳۷۶ تا ۱۳۹۱ میزان شیوع عفونتهای بیمارستانی سودوموناسی، ۲۶/۷۸ درصد برآورد شده است (۱). وجود سویه های مقاوم *P.aeruginosa* که از طریق مکانیسمهای مختلف مثل غیرفعال سازی آنزیمی دارو، سیستمهای تراوشی (۵) و نفوذپذیری پایین (۱۷) به آنتی بیوتیکها ایجاد شده است موجب مرگ بیماران می گردد.

پیراکتام که از ترکیب دو آنتی بیوتیک پیراسیلین و تازوباکتام است از آنتی بیوتیکهای مؤثر در درمان عفونتهای سودوموناسی است و اثر باکتروسیدی خود را به واسطه پیراسیلین اعمال می‌کند. این آنتی بیوتیک در خانواده بتالاکتامها قرار گرفته و در دسته پنی‌سیلینهای مخصوص سودوموناس است (۲۹). یکی از راهکارهای افزایش راندمان درمان همراه با کاهش اثرات جانبی آنتی بیوتیک، بهره‌گیری از سیستمهای دارورسان مثل لیپوزوم است. حاملین دارو می‌توانند با محصور کردن دارو سمیت آن را در بدن کاهش و نیمه عمر آن را با محافظت از آنزیمهای تجزیه‌کننده افزایش دهند که به موجب آن، نیاز به دوز کمتری از دارو می‌باشد (۲۵). زیست سازگاری از ویژگیهای مثبت لیپوزومهاست که می‌تواند آن را از دیگر سامانه‌های دارورسان متمایز کند (۲۱). این سامانه قادر به انتقال دارو به بخشهای عمیق پوست بوده و کاندید مناسبی برای درمانهای موضعی است (۱۰) همچنین با کنترل اندازه ذرات لیپوزومی می‌توان دارورسانی به بخشهای تحتانی ریه را امکان پذیر کرد (۳۱). لیپوزومهای حامل آنتی بیوتیک، با افزایش نفوذپذیری باکتری به دارو می‌تواند موجب کاهش MIC شود (۱۵). مطالعات فراوان صورت گرفته بر روی اثرات ضد میکروبی لیپوزومها باعث تولید داروی تجاری با فرمولاسیون لیپوزومی آمفوتریسین B بر علیه پاتوژن لیشمانیا در بیماری سالک با نام آمفولیش شده است، به این ترتیب شکل لیپوزومی دارو برای مقابله با

انکپسولاسیون علاوه بر تزریق محلول‌های سوپرناتانت حاصل از هر فرمولاسیون، یک محلول دارویی پپیراکتام نیز به عنوان شاخص اندازه‌گیری به دستگاه تزریق شد سپس از مقایسه سطح زیر منحنی انواع سوپرناتانتها با محلول دارویی پپیراکتام، غلظت داروی انکپسوله نشده محاسبه شد و در نهایت با کمک فرمول زیر (۱۹)، درصد انکپسولاسیون به دست آمد.

$$\frac{\text{مقدار داروی درون سوپرناتانت} - \text{مقدار کل دارو}}{\text{مقدار کل دارو}} \times 100\%$$

شناسایی و جداسازی سویه های بالینی *P.aeruginosa*: نمونه های میکروبی مورد استفاده در این تحقیق از کشت ادرار بیماران بستری در بیمارستان میلاد تهران به دست آمد. تولید پیگمان سبز-آبی قابل انتشار در محیط کشت علامت اولیه در تشخیص *P.aeruginosa* بود. برای کشت و جداسازی *P.aeruginosa* از سایر باکتریها و قارچها از محیط انتخابی مانند آگار حاوی استیل تری آمونیم بروماید و برای تایید از تستهای بیوشیمیایی مختلف استفاده شد که شامل محیط مک کانگی آگار، تست اکسیداز، محیط کشت TSI، بررسی تحرک و رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هیتون آگار، تست کاتالاز، سیمون سترات، MR و VP بود (۶ و ۳۸).

تهیه آنتی بیوگرام: آنتی بیوگرام دو جدایه بالینی ۶۰ و ۶۲، و یک سویه استاندارد ATCC27853 به روش انتشار در آگار با کمک دیسکهای آنتی بیوتیک جنتامایسین، مروپنم، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و لوفلوکساسین انجام شد.

اندازه گیری کمترین غلظت مهارکنندگی: نمونه های میکروبی مورد بررسی شامل جدایه های ۶۰ و ۶۲ و نمونه کددار ATCC27853 *P.aeruginosa* بود. MIC فرمولاسیونهای مختلف لیپوزومی شامل خشتی، آنیونی، کاتیونی حاوی پپیراکتام و بدون پپیراکتام، و همچنین

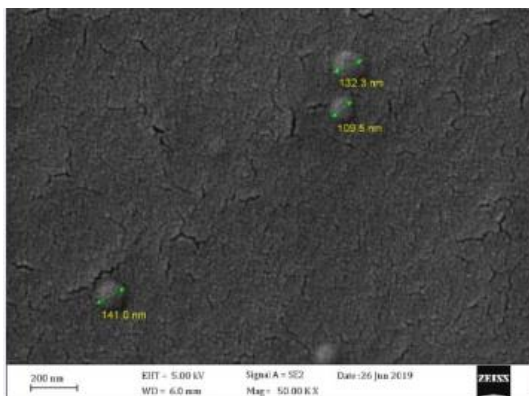
همراه ۲۰ میلی مولار کلسترول و ۲۰ میلی مولار دی ستیل فسفات (شرکت سیگما) مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون میکروسکوپ الکترونی: جهت ارزیابی شکل گیری ساختارهای کروی لیپوزومی، یک قطره از فرمولاسیون لیپوزوم خشتی بر روی گرید قرار داده شد و پس از خشک شدن، شکل فرمولاسیون با بزرگنمایی ۵۰۰۰۰ برابر توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM محصول ZEISS آلمان (در شرکت دی پترونیک) مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

سنجش بار و اندازه: برای اندازه گیری بار، ۵۰ میکرو لیتر از نمونه با ۹۵۰ میکرو لیتر از NaCl ۱۰ میلی مولار رقیق و توسط دستگاه زتا سایزر Malvern سری ۶ ارزیابی شد. اندازه ذرات هر فرمولاسیون پس از رقیق سازی با آب مقطر از طریق تکنیک DLS با کمک دستگاه Malvern (در شرکت دی پترونیک) اندازه گیری شد (۲۴).

اندازه گیری درصد انکپسولاسیون: ارزیابی درصد انکپسولاسیون از روش غیرمستقیم بود. در این روش ابتدا جداسازی بخش لیپوزومی از فاز پیوسته اطراف آن با کمک دستگاه سانتریفیوژ (HANIL کره جنوبی مدل Micro17tr) در مدت یکساعت در دمای ۱۰ درجه و سرعت ۱۷۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. سپس با دقت فاز شفاف رویی (سوپرناتانت) برداشته شد تا برای اندازه گیری مقدار داروی کپسوله نشده به دستگاه HPLC ساخت شرکت Waters آمریکا (در دانشگاه بقیه الله) تزریق شود. روش اندازه گیری غلظت پپیراکتام با کمک تکنیک HPLC، به روش ایزوکراتیک بوده و شرایط آن شامل بهره گیری از ستون C18، فاز متحرک شامل متانول ۳۰ درصد، ارتوفسفونیک اسید به نسبت ۲۰درصد و استونیتریل به نسبت ۵۰ درصد می باشد، دتکتور به کار رفته در این روش، اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۲۶ نانومتر است و دما و حجم تزریق به ترتیب ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰ میکرو لیتر می باشد (۴۰). برای اندازه گیری درصد

۱۱۷/۷ نانومتر کوچکتر از ذرات فرمولاسیون خنثی با مقدار ۱۳۳/۸ نانومتر بوده است.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از فرمولاسیون خنثی لیپوزومی

بررسی شاخص پراکندگی اندازه ذرات (PDI) نشان می‌دهد که فرمولاسیون آنیونی با مقدار عددی ۰/۳۶۱ دارای کمترین پراکندگی اندازه ذرات در میان سه نوع فرمولاسیون بوده است. هر چه شاخص پراکندگی مقدار عددی کوچکتری داشته باشد نشان دهنده تشکیل فرمولاسیون بهینه تری می‌باشد که به این ترتیب در این مطالعه فرمولاسیون آنیونی از نظر اندازه و شاخص پراکندگی نسبت به دو فرمولاسیون دیگر بهتر است (جدول ۱). بار ذرات لیپوزومی از دیگر ویژگی‌های بیوفیزیکی است که برای القا بار مثبت از استتاریل امین و بار منفی از دی ستیل فسفات استفاده شد که به ترتیب بار فرمولاسیونهای کاتیونی و آنیونی ۲۶/۹ و ۲۳/۵- میلی ولت به دست آمد. مقدار بار فرمولاسیون خنثی نیز ۶/۵۶- میلی ولت ارزیابی شد که در محدوده بار خنثی می‌باشد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بار انواع فرمولاسیونهای نشان داد (جدول ۱) درصد مواد بکار گرفته شده جهت القاء بار مورد نظر در ذرات لیپوزومی به شکل موفقیت آمیزی انجام شده است.

برای اندازه‌گیری درصد انکپسولاسیون، غلظت معینی از پپراکتام را به دستگاه HPLC تزریق کرده سپس با مقایسه سطح زیر منحنی پیک اصلی محلول دارویی پپراکتام با

محلول پپراکتام مورد بررسی قرار گرفت. طبق CLSI 2020 از روش رقیق سازی مایع برای اندازه‌گیری کمترین غلظت مهارکنندگی استفاده شد. برای این منظور محیط کشت مولر هیتون براث، فرمولاسیون دارویی و سوسپانسیون میکروب مورد نظر با سه بار تکرار به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و غلظت فرمولاسیون‌ها از چاهک اول تا انتها با رقیق سازی سریالی کاهش یافت بطوریکه هر فرمولاسیون ابتدا توسط بافر تا غلظت ۲/۰۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر رقیق شده سپس رقیق سازی سریالی با کمک محیط کشت انجام گرفت، پس از اضافه شدن سوسپانسیون میکروبی با رقت یک صدم نیم مک فارلند به هر چاهک، پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. در ادامه محلول نمک تترازولیوم به چاهکها اضافه شد که مشاهده رنگ قرمز نشان دهنده رشد باکتری بوده است و کمترین غلظت فرمولاسیون که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان کمترین غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

نتایج

برای اطمینان از تشکیل ذرات کروی لیپوزومی توسط تکنیک به کار گرفته شده، از فرمولاسیون لیپوزومی خنثی برای تهیه تصویر استفاده شد. تصویر حاصل از این فرمولاسیون به روشنی حضور ذرات کروی را تأیید می‌کند و به این ترتیب روش ساخت فرمولاسیون لیپوزومی تأیید می‌شود. قطر چند ذره لیپوزومی که در محدوده تصویربرداری میکروسکوپ قرار داشتند نشان از شکل‌گیری ذرات کوچکتر از ۱۵۰ نانومتر بوده است (شکل ۱).

پس از حصول اطمینان از تشکیل ذرات کروی، بررسی اندازه ذرات برای انواع فرمولاسیونهای خنثی، کاتیونی و آنیونی انجام شد. میانگین اندازه ذرات محاسبه شده توسط تکنیک DLS، نشان داد فرمولاسیون آنیونی با میانگین ۸۳/۸۱ نانومتر کوچکترین اندازه ذرات را به خود اختصاص داده است سپس فرمولاسیون کاتیونی با میانگین

MIC انواع فرمولاسیون‌ها در برابر دو جدایه بالینی و نمونه استاندارد *P.aeruginosa* که به روش رقیق‌سازی سریالی بدست آمد در جدول ۵ درج شده است. در بررسی MIC همه تکرارها نتیجه یکسانی را نشان داد.

بحث

P.aeruginosa به عنوان یکی از عوامل مهم عفونتهای بیمارستانی بوده (۴) که برای مقابله با آن از ترکیب چند خانواده آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌شود (۱۸). به موازات ظهور آنتی‌بیوتیکهای جدید، مکانیسمهای مقاومتی در باکتریها نیز توسعه یافته و سویه‌های مقاوم شکل می‌گیرند؛ از این رو استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیکها پس از مدتی اثر درمانی خود را از دست داده و فقط عوارض جانبی آن باقی می‌ماند.

سطح زیر منحنی محلولهای سوپرناتانت انواع فرمولاسیونهای لیپوزومی، درصد انکپسولاسیون فرمولاسیون خشی ۲۶/۵، کاتیونی ۳۱/۸ و آنیونی ۳۷/۶ درصد به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۱- اندازه و بار ذرات لیپوزوم

بارذرات	PDI	اندازه نانومتر	نوع لیپوزوم
-۶/۵۶	۰/۷۷۹	۱۳۳/۸	خشی
۲۶/۹	۰/۴۵۱	۱۱۷/۷	کاتیونی
-۲۳/۵	۰/۳۶۱	۱۳/۸۱	آنیونی

پس از جداسازی و انجام تستهای بیوشیمیایی بر روی نمونه‌های بالینی (جدول ۳)، دو جدایه ۶۰ و ۶۲ به نمایندگی انتخاب شد و تستهای آنتی‌بیوگرام بر روی آنها و نمونه استاندارد انجام گرفت که نتایج آن در جدول ۴ آمده است.

جدول ۲- نتایج درصد انکپسولاسیون فرمولاسیون مختلف

نمونه‌ها	سطح زیرمنحنی	غلظت سوپرناتانت mg/ml	غلظت دارو mg/ml	داروی درون لیپوزوم mg/ml	درصد انکپسولاسیون
خشی	۱۸۳	۱۶/۶	۲۲/۶	۶	۲۶/۵
کاتیونی	۱۷۱	۱۵/۴	۲۲/۶	۷/۲	۳۱/۸
آنیونی	۱۵۶	۱۴/۱	۲۲/۶	۸/۵	۳۷/۶

جدول ۳- نتایج تست بیوشیمیایی

نوع تست	رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	اکسیداز	تولید پیوسیانین	اوره	TSI	رشد در ۴۲ درجه	سیمون سیترات	MR	VP
نتایج	-	+	+	+	+	قلیایی/قلیایی	+	+	-	-

جدول ۴- آنتی‌بیوگرام سویه‌های باکتری

نمونه	جتامایسین	مروپنم	سفتازیدیم	سیپروفلوکساسین	تورامایسین	لوفلوکساسین
ATCC 27853	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم
۶۰	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم
۶۲	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم

جدول ۵- کمترین غلظت مهارکنندگی فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزومی

نوع فرمولاسیون	ATCC27853	جدایه ۶۲	جدایه ۶۰
داروی آزاد	۴	۸	*۸
لیپوزوم ختنی	۴	۳۲	۱۶
لیپوزوم کاتیونی	۴	۸	۳۲
لیپوزوم آنیونی	۱	۲	۱
لیپوزوم بدون دارو	در همه رقتها رشد	در همه رقتها رشد	در همه رقتها رشد

• همه غلظت‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر است

سلول به هم ریخته و مرگ باکتری را به دنبال دارد (۱۴) و (۴۱). نفوذپذیری پایین غشای سودوموناس، که باعث مقاومت این باکتری در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها شده است از جمعیت کم پورینها، کنفورماسیون بسته آنها و حضور پمپهای تراوشی نشأت گرفته است (۴۱). طبق استانداردهای CLSI 2020 (۱۲)، میکروارگانسیم‌هایی که MIC آن‌ها در حضور پپراکتام بیشتر از ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر باشد مقاوم تلقی می‌شوند. پپراکتام که دارویی هیدروفیل می‌باشد با کمک تکنیک ساده تبخیر فاز حلال، در ساختار لیپوزومی کپسوله می‌شود. عکس میکروسکوپ الکترونی از فرمولاسیون لیپوزومی بر حضور ذرات کروی که نشان دهنده شکل گیری لیپوزوم بود دلالت داشت. اندازه ذرات در همه فرمولاسیونها کمتر از ۱۵۰ نانومتر بوده که با توجه به عدم استفاده از تکنیکهای کوچک سازی مثل اکسترودر، سونیکاسیون و ... امکان تهیه لیپوزوم در ابعاد نانو میسر شده است. پتانسیل زتا فرمولاسیونها نیز با توجه به مواد بکار رفته در تهیه آنها در سه حالت ختنی ۶/۵۶-، کاتیونی ۲۶/۹ و آنیونی ۲۳/۵- میلی ولت حاصل شد. درصد انکپسولاسیون دارو درون لیپوزومهای ختنی، کاتیونی و آنیونی به ترتیب ۲۶، ۳۱ و ۳۷ درصد بوده است. این مقادیر درصد انکپسولاسیون با توجه به ویژگی هیدروفیلی داروی پپراکتام مناسب می‌باشد به طوری که در مطالعات مشابه، درصد انکپسولاسیون داروی جنتامایسین (۳۳) و آزیترومایسین، به ترتیب ۴/۵ و ۲۳ درصد و در بهترین حالت برای کلاریترومایسین ۳۰ درصد

وجود این نقایص محققین را به سمت تولید سامانه‌های دارورسان با ابعاد نانو مثل لیپوزوم، کیتوزان، آلژینات، میسل‌های پلیمری، دندریمرها، نانوکریستالها و ... سوق داده است (۲ و ۲۸). لیپوزومها علی‌رغم گران قیمت بودن و مشکلاتی که در مسیر تهیه آن وجود دارد، قادر به تأخیر کلیرانس دارو بوده و می‌تواند باعث کند کردن متابولیسم دارو، کاهش حجم توزیع دارو و تغییر توزیع به سمت بافت هدف شود که بدین ترتیب شاخص درمانی دارو بهبود می‌یابد (۸). همچنین فرمولاسیونهای لیپوزومی حاوی آنتی بیوتیک از جنبه‌های مختلفی مثل انتقال بهتر دارو به سطوح پایین پوست (۲۳)، ارسال دارو به بخشهای پایین ریه (۱۵)، افزایش عمر داروهای ناپایدار (۱۵)، کاهش عوارض جانبی دارو (۳۹) و افزایش قدرت ضد میکروبی بررسی شدند (۲۶). پپراکتام در دسته پنی‌سیلینهای مخصوص سودوموناس بوده (۲۹) و برای رسیدن به محل اثر خود از پورینها (omp) که در غشای خارجی باکتریهای گرم منفی قرار گرفته‌اند عبور کرده سپس وارد فضای پری پلاسمی می‌شود. در فضای پری پلاسم واحد‌های پپتید و گلیکانی (مولکولهای N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید) به یکدیگر متصل شده‌اند. جهت اتصال عرضی ردیفها، آنزیمی به نام ترانس پپتیداز فعالیت کرده تا در نهایت بخشی از دیواره سلولی بنا شود، حال آنتی بیوتیکهای پنی‌سیلین- مانند پس از ورود به فضای پری پلاسمی به آنزیم ترانس پپتیداز متصل شده و فعالیت آن را مهار می‌کند که متعاقباً یکپارچگی ساختار پری پلاسم و

الف) افزایش MIC: در تیمار جدایه های ۶۲ و ۶۰ به ترتیب با لیپوزومهای خنثی و کاتیونی چهار برابر قدرت ضد میکروبی در مقایسه با داروی آزاد کاهش یافته است. در بررسیهای Omri و همکارانش در سنجش قدرت ضد میکروبی لیپوزوم آنتی بیوتیکهای تویرامایسن، متی سیلین و آمیکاسین بر سودوموناس، ۴ تا ۸ برابر افزایش MIC نسبت به داروی آزاد گزارش شد (۲۷)؛ چنین نتیجه ای در مطالعه McAllister و همکاران از اثر انواع فرمولاسیونهای لیپوزومی پلی میکسین بر سودوموناس نیز به دست آمد (۲۲).

ب) MIC همسان: پیراکتام آزاد و محصور شده در لیپوزومهای خنثی و کاتیونی تغییری بر MIC سویه استاندارد نشان نمی دهد. لیپوزوم کاتیونی نیز در غلظتی مشابه با داروی آزاد، قادر به مهار رشد جدایه ۶۲ است. Yang Li و همکارانش در بررسی قدرت ضد میکروبی لیپوزوم کلیستین بر استافیلوکوکوس ارئوس MIC همانند داروی آزاد به دست آوردند (۲۰).

ج) کاهش MIC: کمترین غلظت مهارکنندگی لیپوزوم آنیونی پیراکتام بر روی هر سه سویه کمتر از داروی آزاد بوده و بین ۴ تا ۸ برابر قدرت ضد میکروبی آنها بیشتر است. در مطالعه Derbali و همکارانش که به تهیه و اثر فرمولاسیونهای لیپوزوم آنیونی، کاتیونی و پلیمری حاوی لووفلوکساسین برای درمان عفونتهای *P.aeruginosa* در بیماران سیستمیک فیبروزیس پرداخته اند لیپوزوم آنیونی کارآمدترین فرمولاسیون معرفی شده است (۱۳). Omri و همکاران نیز MIC لیپوزوم آنیونی حاوی متی سیلین را نصف داروی آزاد ارزیابی کردند (۲۷). کاهش MIC آنتی بیوتیک های محصور شده در فرمولاسیونهای لیپوزومی به دلیل افزایش نفوذ پذیری غشای باکتریها در مجاورت ساختارهای لیپوزومی است که با مکانیسمهای مختلفی انجام می شود. لیپوزومهای کاتیونی با ایجاد منفذ در دیواره باکتری شانس ورود دارو را افزایش می دهند. در غشای

به دست آمده است (۹). دلیل درصد انکپسولاسیون پایین داروهای محلول در آب که از روش تبخیر فاز حلال تهیه شده اند، محدودیت فضای داخلی لیپوزوم است که با دیگر لایه های فسفولیپیدی پر شده و فضای کافی برای محلول دارویی موجود نیست (۳۰).

در بخش میکروبی، دو جدایه بالینی با کدهای ۶۰ و ۶۲، و یک سویه استاندارد (*P.aeruginosa* ATCC 27853) برای مطالعه اثرات فرمولاسیونها در نظر گرفته شدند. طبق آنتی بیوگرام، رفتار مشابهی از نظر مقاومت و حساسیت در هر سه سویه مورد مطالعه دیده شد این سویه ها از یک سو به مکانیسم مهار سنتز پروتئین توسط تویرامایسن مقاوم بوده و از سوی دیگر در برابر همین مکانیسم اعمال شده از طرف آنتی بیوتیک جنتامایسن حساس بودند؛ همچنین سیپروفلوکساسین قادر به توقف سنتز DNA در هر سه سویه بوده اما لووفلوکساسین اثر نامبرده را نمی توانست اعمال کند. در نهایت این سویه ها در مجاورت سفنازیدیم و یا مروپنم به دلیل مهار سنتز دیواره سلولی (۱۴) از بین رفته و اثرات باکتری کشی این آنتی بیوتیکها بر سویه های مذکور مشاهده شد.

اما رفتار این سویه ها در مجاورت فرمولاسیونهای مختلف شامل داروی آزاد، لیپوزوم خالی، لیپوزومهای خنثی، کاتیونی، آنیونی حاوی پیراکتام پاسخهای همسانی در برنداشت به طوری که MIC داروی آزاد پیراکتام بر روی سویه استاندارد ۴ و برای هر دو جدایه (کدهای ۶۰ و ۶۲) ۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود که بر اساس تعریف 2020 CLSI (۱۲) همگی به پیراکتام حساس بودند. اما غلظت باکتریوسیدی جدایه ها دو برابر سویه استاندارد بوده است. عدم اثرگذاری لیپوزوم بدون دارو بر مهار رشد باکتری دلالت بر این امر دارد که بین ذرات لیپوزومی و باکتری برهمکنشی رخ نداده است (۲۷) و اما مقایسه نتایج کمترین غلظت مهارکنندگی فرمولاسیونهای لیپوزومی با داروی آزاد سه نوع پاسخ را نشان می دهد.

مطالعه Robinson و همکارانش که به مهار رشد فاز بیوفیلمی استریپتوکوکوس سالیواریوس با کمک انواع لیپوزوم‌های تریکلوزان پرداختند، لیپوزوم آنیونی تریکلوزان را مؤثرتر از کاتیونی گزارش کردند (۳۲). مطالعه Derbali و همکارانش نیز از علل کارآمدی لیپوزوم آنیونی نسبت به کاتیونی، پروفایل آزادسازی لوفلوکسازین معرفی کرده است (۱۳). در این تحقیق نیز لیپوزوم آنیونی با کاهش MIC پیراکتام بهترین فرمولاسیون لیپوزومی بوده و قدرت ضد میکروبی پیراکتام را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری کلی

برای درمان عفونت‌های بیمارستانی حاصل از *P.aeruginosa* نیاز به توسعه فرمولاسیون‌های دارویی است که افزایش راندمان درمان را به دنبال داشته باشد. لیپوزومها به عنوان سامانه‌های دارورسان زیست سازگار و تقویت کننده اثر آنتی بیوتیکها در انواع فرمولاسیون‌های خنثی، کاتیونی و آنیونی حاوی پیراکتام تهیه شدند. لیپوزوم نوع آنیونی پیراکتام قدرت ضد میکروبی بیشتری نسبت به داروی آزاد، لیپوزوم‌های کاتیونی و خنثی نشان داد که احتمالاً به دلیل پروفایل آزادسازی دارو می‌باشد. این فرمولاسیون که از درصد انکپسولاسیون قابل قبول، اندازه کوچک، بار منفی (که برای سلول‌های بدن سمی نیست) و پایداری فیزیکی خوبی برخوردار بوده است می‌تواند گام اولیه جهت توسعه لیپوزوم پیراکتام باشد.

تشکر و قدر دانی

از همکاری کارکنان آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا در پیشبرد این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

خارجی باکتریها فسفولیپیدهای آنیونی و فسفاتیدیل اتانول آمین دیده می‌شود که در مجاورت لیپوزوم‌های کاتیونی آرایش آنها تغییر کرده و در اثر بازآرایی مرزهای معیوبی با دیگر فسفولیپیدها ایجاد می‌کند. همین مسئله باعث شکل‌گیری منفذ در ساختار غشای باکتری شده و آنتی بیوتیک بیشتری وارد باکتری می‌شود (۱۵). در مکانیسم دیگری که در مواجهه لیپوزوم‌های فزوزنیک با غشا باکتریها مشاهده می‌شود لیپوزوم با غشای باکتری ممزوج شده سپس دارو به درون باکتری آزاد می‌شود (۳۰). در ساخت لیپوزوم‌های فزوزنیک حضور فسفولیپیدهای اتانول آمین ضروری است (۳۶).

رهایش دارو از ذرات لیپوزومی در مجاورت غشای باکتری، باعث افزایش شیب غلظت دارو به درون باکتری شده و شانس ورود مولکول‌های دارو را افزایش می‌دهد. این متداول ترین مکانیسم لیپوزوم برای افزایش نفوذپذیری غشای باکتری است که تحت تأثیر عوامل متعددی همانند ترکیب فسفولیپیدی لیپوزوم، بار لیپوزوم، درصد انکپسولاسیون، پروفایل آزادسازی دارو از لیپوزوم و تعداد ذرات لیپوزوم قرار دارد (۲۲).

در اکثر مطالعات لیپوزومی به دلیل وجود بار منفی در غشای باکتری (*P.aeruginosa* ۲۶- میلی ولت) شکل‌گیری منفذها در حضور لیپوزوم‌های کاتیونی محتمل بوده که موجب کاهش MIC می‌شود اما در پژوهش حاضر لیپوزوم‌های آنیونی اثرگذاری بیشتری نسبت به کاتیونی دارند که با توجه به درصد انکپسولاسیون تقریباً مشابه، پروفایل آزادسازی دارو می‌تواند دلیل MIC پایین تر این فرمولاسیون باشد؛ یعنی لیپوزوم آنیونی بهتر از نوع کاتیونی توانسته است دارو را در مجاورت باکتری آزاد کرده و راندمان بالاتری در انتقال دارو به باکتری داشته باشد. در

منابع

- ۱- باقری پ، سپند م.ر.، (۱۳۹۳). مرور سامانمند و فراتحلیل شیوع و عوامل عفونتهای بیمارستانی در ایران، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۸(۴)، ۱-۱۲
- ۲- توکلی ع، مشایخان ش، بنی اسدی ح، حسن زاده ذ. (۱۳۹۹). طراحی و ساخت میکرواحامل‌های پلیمری قابل تزریق بارگذاری شده با داروی تیکوپلانین. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۳(۴)، ۵۷۵-۵۸۴.
- ۳- حسینی ب، کیانپور ف.، (۱۳۸۹). بررسی سودوموناس اثرورژینوزا جدانشده از عفونتهای پوستی و تعیین الگوی مقاومت دارویی آنها
- ۴- صالح نیا ع. و نجومی، ف. (۱۳۹۹). بررسی فنوتیپی جدایه‌های اسپیتوباکتر بومانی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در مراجعه کنندگان به یک بیمارستان نظامی استان گیلان. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۲(۴)، ۵۷۸-۵۹۰.
- ۵- میرزایی م، قریب ا، اولیا پ.، (۱۳۸۷). مقایسه اثر ضد میکروبی آمیکاسین به فرم آزاد و لیپوزومی بر سودوموناس اثرورژینوزا. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۲(۲)، ۴۸-۴۳.
- 6-Adhikari, L., Roy, K., Tsering, D., Pal, R., & Kar, S. (2010). Susceptibility rates of *Pseudomonas aeruginosa* strains to quinolones. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), 121
- 7-Afkhamzadeh, A., Majidi, F., & Ahmadi, C. (2016). Risk factors for nosocomial infections among burn patients hospitalized in Tohid hospital, Sanandaj, Kurdistan Iran., 59(4), 225-232
- 8-Allen, T. M. (1997). Liposomes. *Drugs*, 54(4), 8-14.
- 9-Alhajlan, M., Alhariri, M., & Omri, A. (2013). Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2694-2704.
- 10-Alhariri, M., Azghani, A., & Omri, A. (2013). Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert opinion on drug delivery*, 10(11), 1515-1532.
- 11-Bohloli Khiavi, R. (2018). Nosocomial infections and their control strategies. *Laboratory & Diagnosis*, 10(40), 39-47. Retrieved from <http://labdiagnosis.ir/article-1-297-fa.html>
- 12- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100, 30 th edition
- 13- Derbali, R. M., Aoun, V., Moussa, G., Frei, G., Tehrani, S. F., Del'Orto, J. C., ... & Chain, J. L. (2019). Tailored nanocarriers for the pulmonary delivery of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative study. *Molecular pharmaceutics*, 16(5), 1906-1916
- 14- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201.
- 15- Epand, R. M., & Epand, R. F. (2011). Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Journal of Peptide Science*, 17(5), 298-305.
- 16- Hassanzadeganroudsari, M., Heydarinasab, A., Chen, P., & Soltani, M. (2019). In vitro investigation of anticancer efficacy of carboplatin-loaded PEGylated nanoliposome particles on brain cancer cell lines. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(6), 1-12.
- 17- Hill, D., Rose, B., pajkos A., Robinson, M., Bye P., Bell, S., Elkins, M., Thompson, B., Macleod, C., Aaron, S.D., Harbour, C. (2005), Antibiotic susceptibilities of *pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic anaerobic and biofilm conditions. *Journal of clinical microbiology*, 43, 5085-5090
- 18- Japoni, A., Alborzi, A., Kalani, M., Nasiri, J., Hayati, M., & Farshad, S. (2006). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns*, 32(3), 343-347.
- 19- Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B. S. F., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., & Rajabi, O. (2016). A comparison of explanation methods of encapsulation efficacy of hydroquinone in a liposomal system. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(2), 23-28.
- 20-Li, Y., Tang, C., Zhang, E., & Yang, L. (2016). Colistin-entrapped liposomes driven by the electrostatic interaction: mechanism of drug

- loading and in vivo characterization. *International journal of pharmaceutics*, 515(1-2), 20-29.
- 21- Mallick, S., Choi, J.S. (2014). Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 755-765.
- 22-McAllister, S., Alpar, H., & Brown, M. (1999). Antimicrobial properties of liposomal polymyxin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(2), 203-210.
- 23-Mezei, M. (1988). Multiphase liposomal drug delivery system. In: Google Patents.
- 24- Moghadas-Sharif, N., Fazly Bazzaz, B. S., Khameneh, B., & Malaekheh-Nikouei, B. (2015). The effect of nanoliposomal formulations on *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(3), 445-450.
- 25-Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Review*, 53(2), 283-318
- 26-Mugabe, C., Halwani, M., Azghani, A. O., Lafrenie, R. M., & Omri, A. (2006). Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6), 2016-2022.
- 27-Omri, A., Ravaoarinoro, M., & Poisson, M. (1995). Incorporation, release and in-vitro antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(4), 631-639.
- 28- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., del Pilar Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 1-33.
- 29-Qadri, S. H., Ueno, Y., Postle, A. G., & Cunha, B. A. (1996). Antibacterial Activity of Tazocin™(Piperacillin/Tazobactam) Against 1296 Clinical Isolates from a Tertiary Care Center. *Annals of Saudi medicine*, 16(4), 377-380.
- 30-Rao, V. S., Peyman, G. A., Khoobehi, B., & Vangipuram, S. (1989). Evaluation of liposome-encapsulated clindamycin in *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *International ophthalmology*, 13(3), 181-185.
- 31- Rabeb Mouna D.Valery A.Ghina M. Giorgia F.Soudeh f.Tehrany.J.P.V.J2019 . Tailored nanocarriers for the pulmonary delivery of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative study. *Molecular pharmaceutics*, 16(5), 1906-1916.
- 32-Robinson, A. M., Bannister, M., Creeth, J. E., & Jones, M. N. (2001). The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 186(1-2), 43-53.
- 33-Rukholm, G., Mugabe, C., Azghani, A. O., & Omri, A. (2006). Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study. *International journal of antimicrobial agents*, 27(3), 247-252.
- 34-Sanderson, N. M., Guo, B., Jacob, A. E., Handley, P. S., Cunniffe, J. G., & Jones, M. N. (1996). The interaction of cationic liposomes with the skin-associated bacterium *Staphylococcus epidermidis*: effects of ionic strength and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1283(2), 207-214.
- 35-Santos, R. S., Figueiredo, C., Azevedo, N. F., Braeckmans, K., & De Smedt, S. C. (2018). Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics. *Advanced drug delivery reviews*, 136, 28-48.
- 36- Kube, S., Hersch, N., Naumovska, E., Gensch, T., Hendriks, J., Franzen, A., Landvogt, L., Siebrasse, J.P., Kubitscheck, U., Hoffmann, B. and Merkel, R., (2017). Fusogenic liposomes as nanocarriers for the delivery of intracellular proteins. *Langmuir*, 33(4), 1051-1059.
- 37- Shi, N.Q., Qi, X.R. (2018). Preparation of Drug Liposomes by Reverse-Phase Evaporation. In: Lu WL., Qi XR. (eds) *Liposome-Based Drug Delivery Systems*. *Biomaterial Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_3-1
- 38-Taghinejad, J., Hosseinzadeh, M., Molayi Kohneshahri, S., & Javan Jasor, V. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*: A biological review. *Laboratory & Diagnosis*, 8(34), 67-82.
- 39-Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2-11.

40-Veni, P. R. K., Sharmila, N., Narayana, K., Babu, B. H., & Satyanarayana, P. (2013). Simultaneous determination of piperacillin and tazobactam in pharmaceutical formulations by RP-HPLC method. *Journal of pharmacy research*, 7(1), 127-131.

41-Yocum, R. R., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L. (1980). The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 255(9), 3977-3986.

Preparation of Pipractam Liposomal Formulations and Evaluation of Antimicrobial effect on *Pseudomonas aeruginosa*

Mirzakhani H.¹, Khoshneviszadeh R.^{2*} and Zare Karizi Sh.³

¹ Dept. of Biotechnical Microbiology, Biological Science College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, I.R. of Iran

² Dept. of Biochemistry and Biophysics, Biological Science College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, I.R. of Iran

³ Dept. of Genetics, Biological Science College, Varamin-Pishva Unit, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, I.R. of Iran

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a prevalent bacteria in nosocomial infections that are resistant to various types of antibiotics by several mechanisms. Nowadays, there utilizes drug delivery methods such as liposomes for boosting the efficiency of treatment. In this study, pipractam, were encapsulated in a variety of liposomal formulations and evaluated for their efficacy by MIC assay. Different liposomes of which incl. neutral, cationic and anionic types were prepared by solvent phase evaporation and their biophysical properties including shape, size and charge were evaluated using electron microscope, DLS and zeta-sizer respectively. The antimicrobial effect of liposomal formulations and drug solution was investigated on two clinical isolates and a standard strain of *pseudomonas aeruginosa* by serial dilution broth and the rate of encapsulation was measured by HPLC technique. The spherical liposome is shown by electron microscope. The size of neutral, cationic and anionic liposome was 8.133, 7.117 and 81.83 nm and the charge of them was obtained -56.6, 9.26 and -5.23 mV, respectively. The HPLC technique evaluated the encapsulation of neutral, cationic and anionic liposomes by 5.26%, 8.31% and 6.37%, respectively. Results of the lowest inhibitory concentration on the standard strain and two isolates 62 and 60 was evaluated for free drug 40, 8, 8; neutral liposomes 4, 32, 16; cationic liposomes 4, 8, 32 and anionic liposomes 1, 2 and 1 µg / ml. Solvent phase evaporation technique made liposomal particles that had small dimensions and a suitable encapsulation percentage. By Comparison of minimum concentration inhibition of different formulations is revealed pipractam anionic liposome was the best formulation that could reduce four folds MIC of pipractam than one's free form on *pseudomonas aeruginosa* in this study.

Keywords: Liposomes, Pipractam, *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial effect