



بررسی اثر لاکتوفرین آزاد و نانولیپوزومی بر بیوفیلم پلی میکروبی مشتق شده از بزاق در مدل *Active Attachment biofilm*

پریسا حبیبی^۱، فریده طباطبایی یزدی^{۲*}، سید علی مرتضوی^۳، محمد مراد فرج الهی^۳

۱-دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲-دکترای صنایع غذایی، استاد گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳-دکترای حرفه‌ای بیوشیمی آزمایشگاهی، استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

پوسیدگی دندان از مشکلات رایج در دنیا هست که ناشی از رشد بیوفیلم پوسیدگی‌زا و تولید اسید توسط آنان است. برای حل این مشکل راهکارهای متعددی به کار گرفته شده است؛ اما به دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌ها و نیاز روزافزون به مواد ضد میکروبی تلاش برای استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی ادامه دارد. لاکتوفرین یک پروتئین در شیر و بزاق است که خواص ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نشان داده است. در این تحقیق ابتدا برای افزایش ویژگی‌ها ضد میکروبی، لاکتوفرین به‌وسیله نانولیپوزوم ریز پوشانی شد. سپس جهت سنجش تأثیر آن بر تعداد باکتری در بیوفیلم پلی میکروبی و تولید اسید، هریک از مواد آزاد یا نانولیپوزومی در ۴ غلظت (۰، ۱، ۵، ۳، ۶ میلی گرم بر میلی لیتر) در مدل *Active Attachment biofilm* به همراه بزاق و محیط کشت گرمخانه گذاری شد. نتایج نشان داد که نانوریزپوشانی لاکتوفرین به دلیل رهایش آهسته لاکتوفرین از لیپوزوم‌ها توانایی مهار بیوفیلم و تولید اسید توسط این باکتری را افزایش داد. با افزایش غلظت لاکتوفرین آزاد و نانولیپوزومی تا غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری‌ها در بیوفیلم نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد ($P < 0/01$)؛ اما افزایش بیشتر غلظت لاکتوفرین آزاد موجب افزایش مجدد تعداد باکتری‌ها در بیوفیلم شد. این در حالی است که لاکتوفرین نانولیپوزومی در غلظت ۶ میلی گرم بر میلی لیتر همچنان باعث کاهش باکتری در بیوفیلم شد که این کاهش نسبت به غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نبود ($P > 0/01$). از نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که از لاکتوفرین نانولیپوزومی می‌توان جهت طراحی محصولات مرتبط با سلامت دهان و دندان استفاده کرد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵

کلمات کلیدی:

لاکتوفرین،

نانولیپوزوم،

بیوفیلم پلی میکروبی،

پوسیدگی دندان.

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.26

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.3.1

* مسئول مکاتبات:

Tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از شایع‌ترین و بی‌خطرترین بیماری‌ها بوده که قابل پیشگیری می‌باشد. تقریباً ۸۰ درصد از بزرگسالان تا سن ۳۴ سالگی پوسیدگی دندان را تجربه می‌کنند. علاوه بر این، ۱۰ درصد از کودکان و ۲۶ درصد از بزرگسالان دارای دندان‌های پوسیده‌ی درمان‌نشده می‌باشند که منجر به آبرسه یا حتی مرگ می‌شود [۱].

غشا مخاطی دهان توسط عوامل عفونی مانند گونه‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی هدف قرار می‌گیرد. قرار گرفتن در معرض عوامل عفونی، ایجاد تغییرات در محیط دهان، تعامل با میکروبیوم^۱ دهان و کاهش دفاع همگی به‌طور بالقوه به توسعه عفونت‌های غشا مخاطی دهان کمک می‌کنند. نتایج نشان می‌دهند رایج‌ترین فرمولاسیون‌های مورد استفاده شامل عوامل درمانی علاوه بر مقاومت میکروارگانیسم‌ها، عوارض جانبی جدی به وجود می‌آورند [۲]. بسیاری از عفونت‌ها و بیماری‌های بدن انسان با پاتوژن‌های دهان مرتبط شده‌اند. به‌عنوان مثال، باکتری‌های موجود در حفره دهانی در بروز اندوکاردیت^۲ و دیابت دخیل بوده‌اند. نه‌تنها این بیماری‌ها بحران سلامتی ایجاد می‌کنند بلکه در بخش بزرگی از هزینه‌های پزشکی نیز سهم دارند. هزینه‌های غیرمستقیم و مستقیم بیماری‌های دندان به‌طور کلی ۴۴۲ میلیارد دلار در سراسر جهان در سال ۲۰۱۰ بود که این امر انگیزه مالی جهانی جهت بهبود مراقبت‌های دندان فراهم می‌کند [۳].

باکتری‌ها در حالت پویا به دو شکل پلانکتونیک و بیوفیلم وجود دارند [۴]. بیوفیلم باکتریایی مرتبط با پوسیدگی دندان، از طریق یک سری مراحل که با اتصال میکروارگانیسم آغاز می‌شود، تشکیل شده و به‌طور برگشت‌پذیر به سطح مینا جذب می‌شود. پس‌از آن، با تولید ماتریس ماده پلیمری خارج سلولی، توسط میکرو کلونی‌های باکتریایی اتصال غیرقابل برگشت رخ می‌دهد که منجر به تشکیل یک بیوفیلم سه‌بعدی می‌شود [۵]. در واقع بیوفیلم یک جمعیت متراکم میکروارگانیسم‌های چسبیده به سطوح طبیعی

یا مصنوعی می‌باشد که باعث مقاومت بالای پاتوژن‌ها در برابر فاکتورهای خارجی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود [۶]. تولید اسید هنگامی اتفاق می‌افتد که قند توسط باکتری‌های بیوفیلم متابولیزه می‌شود و در نتیجه کلسیم و فسفات مینای دندان از بین می‌رود. فرآیند از دست دادن کلسیم و فسفات را دمنرالیزاسیون^۳ می‌نامند. دفع مکرر مواد معدنی در طولانی مدت منجر به تشکیل پوسیدگی دندان می‌شود [۷، ۸].

با استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده‌است و اثرات جانبی منفی که برای میکروبیوم رخ می‌دهد ثبت شده‌است [۹]. پوسیدگی دندان از طریق ماندگاری و عود مجدد بیوفیلم‌های دهان رخ می‌دهد. ما به قرار گرفتن دائم در معرض داروها مانند دهان‌شویه‌ها متوسل می‌شویم تا مانع از رشد این بیوفیلم‌ها شویم. قرار گرفتن دائم در معرض عوامل ضد میکروبی می‌تواند باعث آسیب به میکروبیوم ما شود. درمانی مناسب است که بتواند بیوفیلم بیماری‌زا را به‌طور اختصاصی و کامل، بدون آسیب به باکتری‌های مفید ریشه‌کن کند [۳]. انتخاب ماده ضد میکروبی جهت کاهش میکروارگانیسم‌های پوسیدگی‌زا دشوار است. ماده پلیمری خارج سلولی نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهد و در نتیجه فنوتیپ‌های مقاوم به دارو ایجاد می‌شود. یک عامل ضد میکروبی مؤثر برای غلبه بر نفوذپذیری و مقاومت میکروب، باید بدون شستشوی بزاق در حفره دهان باقی بماند. همچنین، باید غیر سمی و چسبنده باشد [۱۰].

مطالعات متعددی عمل ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد پروتوزوا و ضد انگلی لاکتوفیرین را تأیید می‌کنند [۱۱]. این پروتئین با اتصال به یون Fe^{3+} مقادیر آهن محیط را محدود می‌کند که برای تقسیم و ادامه حیات باکتری بسیار مهم است. همچنین عمل کشندگی لاکتوفیرین مستقل از آهن، در ارتباط با اتصال مستقیم ترمینال N لاکتوفیرین با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) در غشا سلولی باکتری گرم منفی و لیپوتیکوئیک اسید در غشا باکتری گرم مثبت است که به لیزوزیم اجازه دسترسی در پپتیدوگلیکان‌های عمیق‌تر می‌دهد [۱۲]. باور بر این است که لاکتوفیرین نقش مهمی در دفاع حفره دهانی مقابل پاتوژن‌های مسئول فساد دندان و بیماری‌های مربوط به لثه دارد [۱۳]. لاکتوفیرین روی سطح دندان، با باکتری

۱. میکروبیوم به مجموع ژنوم تمامی میکروب‌هایی که بدن انسان میزبان آنها است گفته می‌شود.

2. Endocarditis

3. Demineralization

چسبنده به آگلوتینین بزاقی رقابت کرده که نتیجه آن کاهش چسبندگی پاتوژن‌ها به غشا نازک ساخته شده توسط بزاق است [۱۴]. گذشته از آن، لاکتوفرین باعث جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری می‌شود [۶]. نشان داده شده است که باکتری‌های موجود در بیوفیلم‌ها نسبت به همتایان پلانکتونیک خود نسبت به درمان‌های ضد میکروبی مقاوم‌تر هستند [۱۵-۱۸]. علاوه بر این، مشخص شده است که در بیوفیلم‌های پیچیده چندگونه‌ای، برهمکنش‌های چند میکروبی مقاومت در برابر میکروب‌ها را حتی بیشتر افزایش می‌دهد [۱۹-۲۲]؛ بنابراین، اکنون پذیرفته شده است که مطالعه ترکیبات جدید با هدف تداخل با باکتری‌ها به مدل‌های بیوفیلم چند میکروبی به جای کشت‌های سلولی سنتی باکتریایی نیاز دارد.

ریزپوشانی لیپوزومی به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است [۲۳]. روش‌های ریزپوشانی را می‌توان برای اصلاح و کنترل آزادسازی ماده مؤثره بکار گرفت [۲۴]. علم نانو تحت عنوان بررسی پدیده‌ها و دستکاری مواد در مقیاس‌های اتمی، مولکولی و ماکرومولکولی تعریف می‌شود. در این مقیاس مواد خواص متفاوت‌تری با مقیاس‌های بزرگتر دارند [۲۵]. ترکیب داروها با سیستم‌های نانو ساختار، به‌طور گسترده‌ای قادر به تقویت عملکرد دارو، کاهش دوز مورد نیاز، عوارض جانبی و بهبود فعالیت می‌باشند. برخلاف درمان‌های مرسوم، نانوسیستم‌ها می‌توانند ماده فعال را در طول کل دوره درمان در غلظت مناسب تحویل دهند و آن را به محل مورد نظر عمل هدایت کنند [۲۶]. در این تحقیق اثر لاکتوفرین آزاد و نانولیپوزومی بر زنده‌مانی و تولید اسید توسط بیوفیلم پلی میکروبی دندان‌ی مشتق شده از بزاق در (Active biofilm model (AAA-model Attachment بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

لاکتوفرین گاوی توسط شرکت فناوری بیولوژیکی Xi'an Sgonek کشور چین با خلوص ۹۵ درصد تهیه گردید. سایر مواد مصرفی از شرکت سیگما تهیه گردید.

۲-۲ روش‌ها

۲-۲-۱- تولید نانولیپوزوم لاکتوفرین

برای تهیه سوسپانسیون لیپوزوم از روش توزیع لایه نازک استفاده شد. فسفولیپید، کلسترول، توئین ۸۰ و ویتامین E با نسبت به ترتیب (۰،۰۱۲: ۰،۱۸: ۱: ۶) مخلوط و در اتانول (۹۸ درصد) حل شدند. سپس محلول با استفاده از روتاری اوپراتور غلیظ شد تا لایه نازکی تشکیل شود. فیلم خشک شده با PBS حاوی لاکتوفرین (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط شد و به مدت ۷ دقیقه (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) تحت فراصوت قرار گرفت [۲۷، ۲۸].

۲-۲-۲- خصوصیات نانولیپوزوم‌های حاوی لاکتوفرین

در طی مطالعه قبلی که توسط نویسندگان مقاله حاضر منتشر شده خصوصیات نانولیپوزوم‌های تولید شده (سایز، پتانسیل زتا، PDI، کارایی ریز پوشانی و رهایش مواد از لیپوزوم) بررسی شده‌اند [۲۹].

۲-۲-۳- عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM)

مورفولوژی و شکل لیپوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. مواد خالص سازی و لیوفیلایز شدند. سپس با یون‌های طلا پوشانده شدند و در نهایت توسط SEM مورد بررسی قرار گرفتند [۳۰].

۲-۲-۴- جمع آوری بزاق

این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه فردوسی مشهد (IR.UM.REC.1400.368) و کمیته اخلاق پزشکی مرکز پزشکی دانشگاه VU آمستردام (236/2011) تأیید شد. نمونه بزاق تحریک شده جهت رشد بیوفیلم از یک نفر داوطلب (۳۰ ساله، زن، بدون پوسیدگی فعال) به روش اسپیت اوت و در حین جویدن پایه آدامس جمع‌آوری گردید. اهداکننده موظف بود دندان‌های خود را به مدت ۲۴ ساعت مسواک نزنند و حداقل ۲ ساعت قبل از نمونه‌گیری غذا و آشامیدنی مصرف نکنند. نمونه‌ها سانتریفیوژ گردیدند و برای جلوگیری از آسیب سرمایی در زمان نگهداری، با گلیسرول ۶۰ درصد به میزان دو برابر رقیق شدند و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند [۳۱].

۲-۲-۵- کشت بیوفیلم پلی میکروبی

برای محیط کشت بیوفیلم پلی میکروبی، از محیط کشت Mc Bain با کمی تغییرات استفاده شد. این محیط کشت شامل ۲،۵

پلیت ۶۴ خانه منتقل و با استفاده از آب دیونیزه رقت سازی متوالی انجام شد. سپس جذب چاهک‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. پس از آن به هریک از چاهک‌ها لاکتات دهیدروژناز اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری پلیت در جای تاریک جذب چاهک‌ها دوباره قرائت شد. با توجه به اختلاف جذب دوم و اول و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار تولید اسید لاکتیک محاسبه شد [۳۱، ۳۳].

۲-۲-۷- برداشت بیوفیلم

دیسک‌های شیشه‌ای از درب جدا شده و در آب سیستین پپتون (CPW) قرار داده شد. از اولتراسوند (۱۴۰ وات به مدت ۴۵ ثانیه) برای حذف بیوفیلم‌ها از دیسک‌ها استفاده شد. پس از آن، رقت‌های متوالی تهیه گردید. رقت‌ها روی محیط تریپتیک سوی آگار بلاد^۱ (TSAB) توسط دستگاه اتومات کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند [۳۱].

۲-۳- تحلیل آماری

نتایج مطالعه توسط Minitab نسخه 18.0 تجزیه و تحلیل شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون نرمال بودن رایان جویز و آزمون نرمال بودن کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تعیین شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خصوصیات نانولیپوزوم لاکتوفیرین

خصوصیات نانولیپوزوم‌های تولید شده که در مقاله قبلی ما بررسی شدند در جدول ۱ آمده است [۲۹].

۳-۲- SEM

به منظور ارزیابی شکل لیپوزوم‌های حاوی لاکتوفیرین قبل از اولتراسوند، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه گردید. مطابق شکل ۲ لیپوزوم‌ها عمدتاً کروی شکل بودند.

Table 1 Characteristics of nanoliposomes containing lactoferrin

Properties	Lactoferrin
Size (nm)	96.84±0.85
PDI	0.187±0.022

1. Tryptic Soy Agar Blood

گرم در لیتر موسین (Sigma M-2378)، ۲،۰ گرم در لیتر باکتو پپتون (Difco 0118-01-8)، ۲،۰ گرم در لیتر بود. تریپتیکاز پپتون (BBL 211921)، ۱،۰ گرم در لیتر عصاره مخمر (Bacto 212750)، ۰،۳۵ گرم در لیتر NaCl، ۰،۲ گرم در لیتر KCl، ۰،۲ گرم در لیتر CaCl₂، ۰،۰۰۱ گرم در لیتر همین (Sigma H-1652)، ۰،۰۰۰۲ گرم در لیتر ویتامین K1 [۳۲]، با ۰،۲٪ ساکارز و ۵۰ میلی‌مول بر لیتر بافر PIPES با pH ۷،۰ بود [۳۱].

از روش ارائه شده توسط اختراکاته و همکاران (۲۰۱۰) برای رشد بیوفیلم استفاده شد. مدل AAA شامل یک درب فولادی ضدزنگ و ۲۴ گیره است که دیسک‌های شیشه‌ای به قطر ۱۲ میلی‌متر به آن وصل می‌شود (Fig 1) [۳۱]. به پلیت‌های ۲۴ خانه لاکتوفیرین (۰،۱۵،۳،۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به صورت آزاد و نانولیپوزومی به همراه محیط کشت Mc Main و بزاق اضافه شد درب مدل بر روی پلیت قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی (۱۰ درصد CO₂، ۱۰ درصد H₂ و ۸۰ درصد N₂) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از ۴۸ ساعت، درب با بافر PBS ۳ مرتبه شستشو داده شد تا باکتری‌های پلانکتونی و بیوفیلم‌های غیر چسبیده جدا شوند.

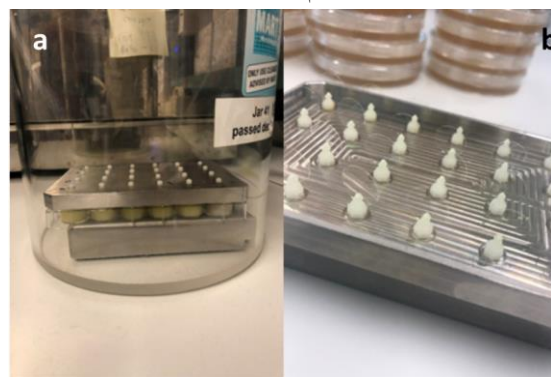


Fig 1: AAA model in anaerobic jar (a), AAA model lid with glass discs (b)

۲-۲-۶- اندازه‌گیری اسید لاکتیک

جهت اندازه‌گیری غلظت اسید لاکتیک تولید شده منحنی استاندارد رسم گردید. پس از تشکیل و قبل از برداشت بیوفیلم، درب مدل روی پلیت ۲۴ خانه حاوی بافر پپتون واتر (BPW) و ساکارز ۰،۲ درصد قرار داده شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتوی هر چاهک به

و هالو، در مهار چسبندگی *S. mutans* به هیدروکسی آپاتیت (HA)، با تقلید از جنس سطح دندان، گزارش شد [۳۷]. شواهد دیگری نشان می‌داد لاکتوفرین چسبندگی *S. mutans* به هیدروکسی آپاتیت را به وسیله باقیمانده ۴۷۳-۵۳۸ در لوب C مهار می‌کند، پژوهشگران تأیید کردند که این فعالیت غیروابسته به ویژگی اتصال به آهن لاکتوفرین بود [۳۸]. لاکتوفرین گاوی مستقل از توانایی اتصال به آهن، چسبندگی باکتری را به سلول میزبان و یا به اجزا سطح میکروبی به وسیله اتصالات رقابتی مختل می‌کند [۳۹]. اولین توضیح از فعالیت حفاظت موکوسی لاکتوفرین در برابر آسیب وارد با چسبیدن *Escherichia coli* HB101 در تحقیقات لونگی و همکاران (۱۹۹۳) ذکر شده است [۴۰]. بعدها مشخص شده که لاکتوفرین می‌تواند اولین قدم برای مهار بیماری‌زایی باکتری را توسط مهار چسبیدن باکتری به سلول میزبان انجام دهد [۳۹]. همه انواع لاکتوفرین قادر به اتصال به سطوح باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هستند [۴۱]. چسبندگی *Pseudomonas aeruginosa* روی لنز پوشیده از لاکتوفرین در مقایسه با نوع بدون پوشش لاکتوفرین کمتر بود [۴۲]. لاکتوفرین همچنین به‌عنوان مهار کننده اتصال *E. coli* (ETEC) به سلول‌های اپیتلیال انسانی و مخاط رودای موش‌های عاری از آلودگی شناخته شده است [۴۳]. تحقیقات دیگری پیشنهاد می‌دهند که لاکتوفرین انسانی و لاکتوفرین نوترکیب انسانی و لاکتوفرین گاوی مهار اتصال *Helicobacter felix* به سلول‌های اپیتلیال شکمی را، شاید به وسیله ارتباط بین گلیکان الیگومونوساکاریدی، لاکتوفرین و اتصال دهنده باکتریایی انجام می‌دهد [۴۴].

نیاز به فلزات مغذی به‌عنوان کوفاکتور در پروسه‌های زیستی متنوع در تمام قلمروهای حیات وجود دارد. باکتری‌های بیماری‌زای مهاجم نیازمند آهن به‌عنوان کوفاکتور برای چرخه‌های سلولی شامل تنفس، تقسیم DNA، هدایت الکتریکی، فرایند کاهش پروکسید، پاسخ استرس و تقسیم سلولی است. میزبان از این نیاز برای فلزات مغذی مانند آهن استفاده کرده و فاکتورهای مختلفی را بکار می‌بندد تا اتصال آهن با تمایل بالا، به‌طور مؤثری پاتوژن مهاجم را تضعیف کند [۴۵]. لاکتوفرین علاوه بر تخریب و کشنده بودن برای بیوفیلم، توانایی درگیر کردن سیستم ایمنی ذاتی در پالایش باکتریایی را دارد. یک مطالعه نشان داد که

Zeta potential (mv)	-24.79±2.70
Encapsulation efficiency (%)	73.01±1.64
Release (24h)	60%
Reported values correspond to the mean ± standard deviation.	
PDI: Polydispersity index	

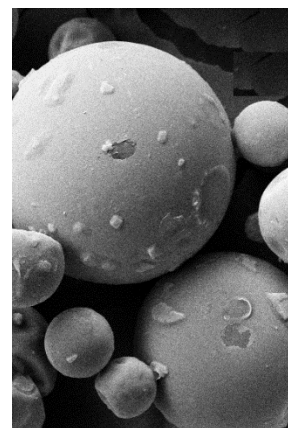


Fig 2 Electron microscope image of liposome containing curcumin before sonication

۳-۳- اثر لاکتوفرین بر بیوفیلم پلی میکروبی

در این تحقیق برای رشد بیوفیلم از مدل (AAA) استفاده شد. گزارش شده است که این مدل برای ارزیابی اثرات عوامل پیشگیری کننده از پوسیدگی مناسب است [۳۱]. در مدل (AAA)، نوع بیوفیلم می‌تواند در یک پلیت تشکیل شود و شرایط مختلف تیمار و کنترل می‌تواند به‌طور همزمان روی بیوفیلم‌ها اعمال شود [۳۴]. تأثیر لاکتوفرین آزاد و نانولیپوزومی بر بیوفیلم پلی میکروبی در شکل ۳ نشان داده شده است. لاکتوفرین آزاد در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به کاهش معنی‌داری در تعداد باکتری در بیوفیلم شد ($P < 0.01$)؛ اما با افزایش غلظت لاکتوفرین تعداد باکتری در بیوفیلم مجدداً افزایش یافت.

حفره دهان یک اکوسیستم پیچیده است که یکی از متنوع‌ترین جمعیت‌های میکروبی یافت‌شده در بدن انسان را در خود جای داده است [۳۵]. بیش از ۷۰۰ گونه در بیش از ۲۰ شاخه در دهان شناسایی شده‌اند. میکروارگانیسم‌های ساکن در دهان بیوفیلم تشکیل می‌دهند و به‌طور محکم به سطوح مختلف متصل می‌شوند [۳۶]. در ۱۹۸۹، توانایی لاکتوفرین، در هر دو شکل آبی

gingivalis شد [۴۹، ۵۲]. لاکتوفیرین همچنین تولید بیوفیلم توسط باکتری *P. aeruginosa* را کاهش داد [۵۳]. ارسلان و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که لاکتوفیرین قادر به مهار رشد *S. mutans*، *S. gordonii*، همچنین کاهش چسبندگی اولیه آن‌ها بود [۵۲]. همچنین لاکتوفیرین در ترکیب بر توانایی باکتری‌ها برای چسبیدن به سطح دندان تأثیر می‌گذارد [۵۰].

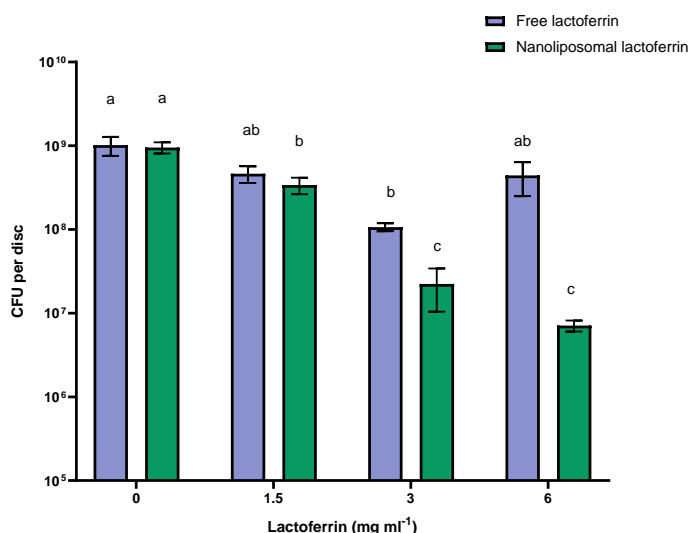


Fig 3 Effect of free lactoferrin and nanoliposomal lactoferrin on CFU of Poly microbial biofilms. Data represent mean \pm standard deviation (n=3). Statistical significance between the groups was calculated by Tukey Method. Data points at the same substances (free or nanoliposomal lactoferrin) labeled with the same character are not statistically different (P>0.01).

باکتری *S. mutans* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های مولد بیوفیلم دندان شناخته می‌شود. لاکتوفیرین ممکن است از اتصال *S. mutans* به سطوح هیدروکسی آپاتیت جلوگیری کند [۵۴].
نیمی و همکاران (۲۰۰۹) بخش‌هایی از شیر انسان و پروتئین‌های آب پنیر خالص را ارزیابی کردند و اعلام کردند که لاکتوفیرین از تماس بین *S. mutans*، بزاق و هیدروکسی آپاتیت پوشیده شده با گلیکوپروتئین‌ها جلوگیری می‌کند [۵۵]. آلیسون و همکاران (۲۰۱۵) نیز اثرات ترکیبات شیر مادر را از جنبه تغذیه‌ای بر پوسیدگی دندان ناشی از بیوفیلم *S. mutans* UA 159 مورد مطالعه قرار دادند. رقت‌های مختلف شیر تشکیل بیوفیلم را کاهش داد. همچنین لاکتوفیرین به‌طور قابل‌توجهی تشکیل بیوفیلم

لاکتوفیرین گاوی می‌تواند معادل آنتی‌بادی در راستای فعال کردن مؤثر مسیر کلاسیک کمپلمان^۱ و القای اپسونیزیشن^۲ *S. agalactiae* کپسوله نشده باشد. کمپلمان خانواده‌ای از پروتئین‌های سیستم ایمنی ذاتی است که به‌صورت آبشاری فعال می‌شود و با حمله کمپلکس به غشا در نتیجه باعث تشکیل منفذ روی غشا باکتری یا اپسونیزیشن توسط فاگوسیت‌ها می‌شود [۴۵]. محققین گزارش کرده‌اند که اتصال لاکتوفیرین به سطوح دندان ضروری نیست. به‌جای آن، جهت مهار چسبندگی باکتری گرم مثبت و گرم منفی به سطوح نیاز به اتصال لاکتوفیرین به باکتری یا تخریب چسبندگی‌ها یا پروتئین‌های سیستم ترشحی می‌باشد [۴۶-۴۸].

واکی بایاشی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که مقدار بیوفیلم از پیش ساخته شده پس از انکوباسیون با لاکتوفیرین گاوی بدون آهن و اشباع از آهن، لاکتوفیرین انسانی، پپتید ضد میکروبی لاکتوفیرین B مشتق شده از لاکتوفیرین به مدت ۵ ساعت کاهش یافت. استفاده از لاکتوفیرین گاوی با اشکال مختلف پیوند با آهن و لاکتوفیرین انسانی منجر به کاهش مقدار بیوفیلم شد زیرا لاکتوفیرین ممکن است با سطح سلول‌های باکتریایی برهمکنش داشته باشد و تماس بین سلول‌های سازنده بیوفیلم و پلاستیک را قطع یا مهار کرده باشد [۴۹].

اریکسون و ارلندسون (۲۰۱۸) توانایی *S. mutans* و *Lactobacillus gasseri* را در شرایط آزمایشگاهی برای چسبیدن به دانه‌های هیدروکسی آپاتیت پوشش داده شده با بزاق در ترکیبات متشکل از محتویات مختلف لاکتوفیرین و آهن بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که مقادیر آهن و لاکتوفیرین در ترکیب بر توانایی باکتری‌ها برای چسبیدن به سطح دندان تأثیر می‌گذارد [۵۰]. موریتا و همکاران (۲۰۱۷) اثرات قرص‌های حاوی لاکتوفیرین و لاکتوپراکسیداز را بر بهبود بهداشت دهان و دندان سالمندان مورد بررسی قرار دادند. مصرف قرص‌ها اثرات ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های پریدنتال^۳ موجود بر روی پوشش زبان و بیوفیلم‌های لثه نشان داد [۵۱]. لاکتوفیرین با ایزوله کردن آهن باعث مهار تشکیل بیوفیلم *S. mutans*، *Prevotella intermedia*، *Porphyromonas*

1. Classical pathway of complement
2. Opsonization
3. Periodontal

تحقیقات متعددی اثر نانوفورمولاسیون بر افزایش خصوصیات ضد میکروبی مواد مختلف را تأیید کردند. کریمی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که نانوذرات ضد میکروبی آویشن، هل و *L. plantarum* اثرات مهاری بر علیه *S. mutans* با MIC و MBC مختلف نشان دادند و آب نبات‌های تهیه شده از این مواد به‌طور قابل توجهی *S. mutans* را در بزاق کاهش داد [۶۳].

۳-۴- تولید اسید لاکتیک

اختراکاته و همکاران (۲۰۱۰) ادعا کردند که اثربخشی ترکیبات پیشگیرانه باید بر روی کاهش تولید اسید (به‌عنوان یکی از پتانسیل‌های پوسیدگی‌زا) و زنده‌مانی باکتری‌ها مورد قضاوت قرار گیرند [۳۱]. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است اثر لاکتوفیرین بر روی تولید اسید بیوفیلم پلی میکروبی در تمام غلظت‌ها در هر دو شکل آزاد و نانوریزپوشانی شده معنی‌دار است ($P < 0.01$). در تحقیقات گذشته استقلال تولید اسید توسط باکتری‌های بیوفیلم نسبت به تعداد آن‌ها بیان شده است [۳۱].

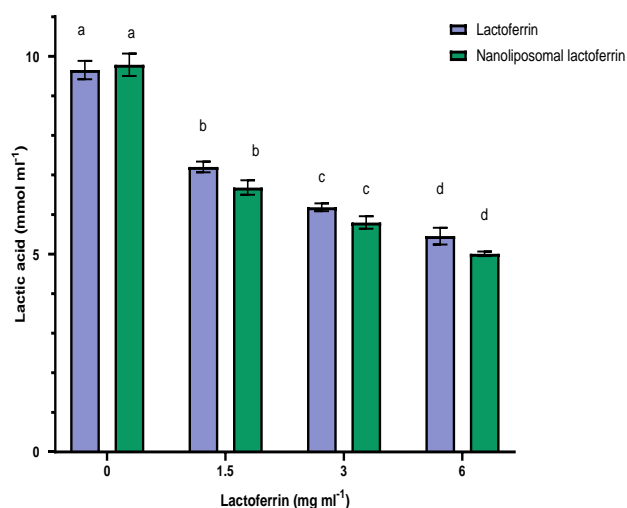


Fig 4 Effect of free lactoferrin and nanoliposomal lactoferrin on the lactic acid production by Poly microbial biofilms. Data represent mean \pm standard deviation (n=3). Statistical significance between the groups was calculated by Tukey Method. Data points at the same substance (free or nanoliposomal lactoferrin) labeled with the same character are not statistically different ($P > 0.01$).

با توجه به اینکه باکتری‌های کریوزنیک می‌توانند قند را تخمیر و تبدیل به اسید کنند، می‌توان نتیجه گرفت که دلیل کاهش تولید اسید در غلظت ۶ میلی‌گرم لاکتوفیرین آزاد علی‌رغم افزایش تعداد

را در تمام رقت‌ها از جمله ۳ میلی‌گرم بر میل لیتر (غلظت لاکتوفیرین در شیر مادر) کاهش داد [۵۶].

گودی پانی و همکاران (۲۰۱۴) همچنین نشان دادند که مسواک زدن با خمیردندان حاوی لاکتوفیرین لاکتوپراکسیداز و لیزوزیم به‌طور قابل توجهی تعداد واحدهای کلنی *S. mutans* را کاهش داد [۵۷]. شین و همکاران (۲۰۱۱) یک کارآزمایی بالینی را برای بررسی اثرات قرص‌های حاوی لاکتوفیرین گاوی و لاکتوپراکسیداز بر بوی بد دهان و باکتری‌های بزاقی انجام دادند. نتایج آن‌ها اثرات سرکوب‌کنندگی مخلوط لاکتوفیرین و لاکتوپراکسیداز را بر بوی بد دهان و باکتری‌ها نشان داد [۵۸].

نکته قابل توجه در این تحقیق این است که افزایش غلظت لاکتوفیرین از ۳ به ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش تعداد باکتری در بیوفیلم شد، به‌طوری‌که تعداد باکتری در بیوفیلم در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ($P > 0.01$). لاکتوفیرین آهن موجود در محیط را جذب کرده و آن را برای میکروارگانیسم‌ها غیرقابل دسترس می‌کند. کاهش ناگهانی محتوای آهن باعث ایجاد استرس می‌شود که منجر به افزایش تولید پلی ساکاریدها و تشکیل بیوفیلم می‌شود [۵۹]. همچنین اثر لاکتوفیرین نانولیپوزومی بر تعداد باکتری در بیوفیلم *S. mutans* هم مشابه نتایج تحقیق حاضر بود [۲۹]. لاکتوفیرین نانولیپوزومی در غلظت بالاتر از ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هم باعث کاهش باکتری در بیوفیلم پلی میکروبی شد. این کاهش نسبت به غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قابل توجه نبود ($P > 0.01$); اما نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.01$).

لیپوزوم‌ها برای افزایش خواص ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی سایر مواد دارویی یا زیست فعال نیز استفاده شده‌اند. فعالیت ضد باکتریایی لیپوزوم‌های حاوی توبرامایسین و توبرامایسین-N-استیل سیستئین در برابر سویه‌های مقاوم به توبرامایسین به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد [۶۰]. نایسین لیپوزومی تا ۶ ساعت پس از انکوباسیون فعالیت بازدارندگی را در برابر تولید بیوفیلم توسط *S. mutans* حفظ کرد، درحالی‌که نایسین آزاد در همان غلظت تولید بیوفیلم را تنها تا ۲ ساعت مهار کرد [۶۱]. اشرفی و همکاران (۲۰۱۹) اسانس *Mentha piperita* را در نانولیپوزوم‌های کیتوزان کپسوله کردند و گزارش دادند که این مواد چسبندگی *S. mutans* را کاهش می‌دهند [۶۲].

- [2] Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(19): p. 5002-5017.
- [3] Scharnow, A.M., A.E. Solinski, and W.M. Wuest, *Targeting S. mutans biofilms: a perspective on preventing dental caries*. MedChemComm, 2019. **10**(7): p. 1057-1067.
- [4] Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. Emerging infectious diseases, 2002. **8**(9): p. 881.
- [5] Jamal, M., et al., *Bacterial Biofilm: Its Composition. Formation and Role in Human Infections Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015. **4**: p. 1-14.
- [6] Rosa, L., et al., *Lactoferrin and oral pathologies: a therapeutic treatment*. Biochemistry and Cell Biology, 2021. **99**(1): p. 81-90.
- [7] Lemos, J., et al., *The biology of Streptococcus mutans*. Microbiology spectrum, 2019. **7**(1): p. 7.1. 03.
- [8] Lemos, J.A. and R.A. Burne, *A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans*. Microbiology (Reading, England), 2008. **154**(Pt 11): p. 3247.
- [9] Gilbert, J.A., et al., *Current understanding of the human microbiome*. Nature medicine, 2018. **24**(4): p. 392-400.
- [10] Kandimalla, K.K., et al., *Ability of chitosan gels to disrupt bacterial biofilms and their applications in the treatment of bacterial vaginosis*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **102**(7): p. 2096-2101.
- [11] Krupińska, A.M. and Z. Bogucki, *Clinical aspects of the use of lactoferrin in dentistry*. Journal of Oral Biosciences, 2021. **63**(2): p. 129-133.
- [12] Leitch, E. and M. Willcox, *Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme*. Journal of Medical Microbiology, 1999. **48**(9): p. 867-871.
- [13] Pedersen, A.M.L. and D. Belstrøm, *The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota*. Journal of dentistry, 2019. **80**: p. S3-S12.
- [14] Oho, T., et al., *A peptide domain of bovine milk lactoferrin inhibits the interaction between streptococcal surface protein antigen and a salivary agglutinin peptide domain*. Infection and immunity, 2004. **72**(10): p. 6181-6184.
- [15] Bjarnsholt, T., et al., *Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear*

باکتری‌ها در بیوفیلم ممکن است به علت کاهش باکتری‌های کریوژنیک و افزایش تعداد باکتری‌های غیرکریوژنیک باشد. میزان کاهش اسید توسط لاکتوفرین نانولیپوزومی در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتر از لاکتوفرین آزاد بود. در مطالعه‌ی قبلی ما مشخص شد که لاکتوفرین نانولیپوزومی تولید اسید توسط بیوفیلم تک‌گونه (*S. mutans*) کاهش داد، اما لاکتوفرین آزاد در غلظت بالا منجر به افزایش اسید لاکتیک شد [۲۹]. محققین از یک مدل دهان مصنوعی برای بررسی اثر لاکتوفرین گاوی بر تولید اسید *S. mutans* و دیمینرالیزاسیون مینای دندان استفاده کرده‌اند. در غلظت‌های بالاتر از ۰٫۵ درصد، لاکتوفرین اثر ضد میکروبی وابسته به دوز بر روی *S. mutans* نشان داد و در مدل دهان مصنوعی بیوفیلم که با ۱ درصد لاکتوفرین و ۱ درصد ساکارز تیمار شده بود، کاهش pH بسیار کندتر بود [۶۴].

۴- نتیجه‌گیری

برای تأیید اثر مواد ضد میکروبی بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان بررسی تأثیر آن‌ها بر بیوفیلم پلی میکروبی از اهمیت بالایی برخوردار است. لاکتوفرین در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست تعداد باکتری در بیوفیلم را کاهش دهد اما با افزایش غلظت لاکتوفرین تعداد باکتری‌ها افزایش یافت. نانولیپوزوم‌های حاوی لاکتوفرین در غلظت بالاتر از ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز باعث کاهش باکتری در بیوفیلم شد. لاکتوفرین نانولیپوزومی اثر بیشتری بر کاهش تولید اسید توسط باکتری‌های بیوفیلم نسبت به فرم آزاد این پروتئین داشت. کاهش تولید اسید نشانه‌ای از تغییر باکتری‌های پوسیدگی‌زا به غیر پوسیدگی‌زا می‌باشد.

۵- سپاسگزاری:

از کارمندان و دانشجویان گروه پیشگیری مرکز مطالعات دندانپزشکی دانشگاه آمستردام، پروفیسور بارت کایجر و دکتر رام اخترکاته که ما را در انجام آزمایش‌ها یاری دادند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

۱۶- منابع

- [1] Amisshah, F., T. Andey, and K.M. Ahlschwede, *Nanotechnology-based therapies for the prevention and treatment of Streptococcus mutans-derived dental caries*. Journal of Oral Biosciences, 2021. **63**(4): p. 327-336.

- medicines: a review*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 1.
- [27] Liu, W., et al., *Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids*. Journal of Dairy Science, 2013. **96**(4): p. 2061-2070.
- [28] Rasti, B., et al., *Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods*. Food chemistry, 2012. **135**(4): p. 2761-2770.
- [29] Habibi, P., et al., *Effects of free and nano-encapsulated bovine lactoferrin on the viability and acid production by Streptococcus mutans biofilms*. Letters in Applied Microbiology, 2022. **75**(3): p. 689-698.
- [30] Vergara, D. and C. Shene, *Encapsulation of lactoferrin into rapeseed phospholipids based liposomes: Optimization and physicochemical characterization*. Journal of Food Engineering, 2019. **262**: p. 29-38.
- [31] Exterkate, R., W. Crielaard, and J. Ten Cate, *Different response to amine fluoride by Streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model*. Caries research, 2010. **44**(4): (p. 372-379.
- [32] McBain, A., et al., *Development and characterization of a simple perfused oral microcosm*. Journal of Applied Microbiology, 2005. **98**(3): p. 624-634.
- [33] Van Loveren, C., J. Buijs, and J. Ten Cate, *The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **45**(2): p. 153-158.
- [34] Silva, T.C., et al., *Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model*. Journal of dentistry, 2012. **40**(1): p. 41-47.
- [35] Consortium, H.M.P., Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
- [36] Mark-Welsh, J., et al. *Biogeography of a human oral microbiome at the micro scale*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2016. **113**: p. E791-E800.
- [37] Visca, P., et al., *Growth and adsorption of Streptococcus mutans 6715-13 to hydroxyapatite in the presence of leukocytes is quorum-sensing dependent*. Microbiology, 2005. **151**(2): p. 373-383.
- [16] Ceri, H., et al., *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(6): p. 1771-1776.
- [17] Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(2): p. 167-193.
- [18] Tenover, F.C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. The American journal of medicine, 2006. **119**(6): p. S3-S10.
- [19] Burmølle, M., et al., *Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(6): p. 3916-3923.
- [20] Kara, D., S.B. Luppens, and J.M. ten Cate, *Differences between single and dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Veillonella parvula in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine*. European journal of oral sciences, 2006. **114**(1): p. 58-63.
- [21] Luppens, S., et al., *Effect of Veillonella parvula on the antimicrobial resistance and gene expression of Streptococcus mutans grown in a dual-species biofilm*. Oral microbiology and immunology, 2008. **23**(3): p. 183-189.
- [22] Ramsey, M.M. and M. Whiteley, *Polymicrobial interactions stimulate resistance to host innate immunity through metabolite perception*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **116**(10): p. 1578-1583.
- [23] Pamunuwa, G., V. Karunaratne, and D. Karunaratne, *Effect of lipid composition on in vitro release and skin deposition of curcumin encapsulated liposomes*. Journal of Nanomaterials, 2016. **2016**.
- [24] Cacciotti, I., et al., *Application of nano/microencapsulated ingredients in chewing gum*, in *Application of Nano/Microencapsulated Ingredients in Food Products*. 2021, Elsevier. p. 345-386.
- [25] Dera, M.W. and W.B. Teseme, *Review on the application of food nanotechnology in food processing*. Am. J. Eng. Technol. Manag, 2020. **5**: p. 41-47.
- [26] Bonifacio, B.V., et al., *Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal*

- [50] Wakabayashi, H., et al., *Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009. **53**:(^):p. 3308-3316.
- [51] Eriksson, E. and E. Erlandsson, *Inhibitory Properties of Lactoferrin on Adhesion of Oral Bacteria to Hydroxyapatite*. 2018.
- [52] Morita, Y., et al., *Effects of lactoferrin and lactoperoxidase-containing food on the oral hygiene status of older individuals: A randomized, double blinded, placebo-controlled clinical trial*. Geriatrics & gerontology international, 2017. **17**(5): p. 714-721.
- [53] Arslan, S., K. Leung, and C. Wu, *The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment*. Oral microbiology and immunology, 2009. **24**(5): p. 411-416.
- [54] Singh, P.K., *Iron sequestration by human lactoferrin stimulates P. aeruginosa surface motility and blocks biofilm formation*. Biometals, 2004. **17**(3): p. 267-270.
- [55] Morrissey, P.E., et al., *Inhibition of Streptococcus mutans binding to hydroxylapatite using partially digested whey protein concentrate and individual whey proteins*. Journal of functional foods, 2012. **4**(2): p. 559-567.
- [56] Niemi, L.D., O. Hernell, and I. Johansson, *Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro*. Caries research, 2009. **43**(3): p. 171-178.
- [57] Allison, L.M., et al., *Effect of human milk and its components on Streptococcus mutans biofilm formation*. Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2015. **39**(3): p. 255-261.
- [58] Gudipaneni, R.K., et al., *Short term comparative evaluation of antimicrobial efficacy of tooth paste containing lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase in children with severe early childhood caries: a clinical study*. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR, 2014. **8**(4): p. ZC18.
- [59] Shin, K., et al., *Effects of a composition containing lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial*. Clinical oral investigations, 2011. **15**(4): p. 485-493.
- [60] Francesca, B., et al., *Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in Streptococcus mutans*. Biometals, 2004. **17**(3): p. 271-278.
- [38] *lactoferrin*. Medical microbiology and immunology, 1989. **178**(2): p. 69-79.
- [39] Oho, T., M. Mitoma, and T. Koga, *Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of Streptococcus mutans cells to a salivary film*. Infection and immunity, 2002. **70**(9): p. 5279-52.۸۲
- [40] Rosa, L., et al., *Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(9): p. 1985.
- [41] Longhi, C., et al., *Influence of lactoferrin on the entry process of Escherichia coli HB101 (pRI203) in HeLa cells*. Medical microbiology and immunology, 1993. **182**(1): p. 25-35.
- [42] Dalmastrì, C., et al., *Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface*. Microbiologica, 1988. **11**(3): p. 225-230.
- [43] Williams, T.J., R.P. Schneider, and M.D. Willcox, *The effect of protein-coated contact lenses on the adhesion and viability of gram negative bacteria*. Current eye research, 2003. **27**(4): p. 227-235.
- [44] Kawasaki, Y., et al., *Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic Escherichia coli to host cells*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2000. **64**(2): p. 348-354.
- [45] Dial, E.J. and L.M. Lichtenberger, *Effect of lactoferrin on Helicobacter felis induced gastritis*. Biochemistry and cell biology, 2002. **80**(1): p. 113-117.
- [46] Lu, J., et al., *Lactoferrin: a critical mediator of both host immune response and antimicrobial activity in response to streptococcal infections*. ACS infectious diseases, 2020. **6**(7): p. 1615-1623.
- [47] Ochoa, T.J., et al., *Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic Escherichia coli*. Infection and immunity, 2003. **71**(9): p. 5149-5155.
- [48] Hendrixson, D., et al., *Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites*. Molecular microbiology, 2003. **47**(3): p. 607-617.
- [49] Rose, J.E., D.H. Meyer, and P.M. Fives-Taylor, *Aae, an autotransporter involved in adhesion of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells*. Infection and immunity, 2003. **71**(5): p. 2384-2393.

- [61] Alarfaj, R.E., et al., *Antibacterial Efficacy of Liposomal Formulations Containing Tobramycin and N-Acetylcysteine against Tobramycin-Resistant Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Acinetobacter baumannii*. *Pharmaceutics*, 2022. **14**(1): p. 130.
- [62] Yamakami, K., et al., *Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by Streptococcus mutans*. *Pharmaceutical biology*, 2013. **51**(2): p. 267-270.
- [63] Ashrafi, B., et al., *Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory effect on biofilm formation against S. mutans on the dental surface*. *Carbohydrate polymers*, 2019. **212**: p. 142-149.
- [64] Karimi, N., et al., *Thymol, cardamom and Lactobacillus plantarum nanoparticles as a functional candy with high protection against Streptococcus mutans and tooth decay*. *Microbial pathogenesis*, 2020. **148**: p. 104481.
- [65] Kaeriyama, E., et al., *Effect of bovine lactoferrin on enamel demineralization and acid fermentation by Streptococcus mutans*. *Pediatric Dental Journal*, 2007. **17**(2): p. 118-126.



Scientific Research

Investigating the effect of free and nanoliposomal lactoferrin on polymicrobial biofilms derived from saliva in an Active Attachment biofilm model

Parisa Habibi¹, Farideh Tabatabaee Yazdi^{2*}, Seyed Ali Mortazavi², Mohammad Morad Farajollahi³

1-Ph.D. student of food science and industry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2-Professor in Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran.

3-PhD in laboratory biochemistry, Professor of Department of Medical Biotechnology, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Tooth decay is one of the most common problems in the world, which is caused by the growth of biofilm and acid production by them. Many solutions have been used to solve this problem. However, due to the increase in antibiotic resistance of microorganisms and the increasing need for antimicrobial substances, efforts are being made to use natural antimicrobial substances. Lactoferrin is a protein in milk and saliva with antimicrobial and anti-biofilm properties. In this research, lactoferrin was encapsulated by nanoliposomes to increase its antimicrobial properties. In order to measure the effect of lactoferrin on the number of bacteria in the polymicrobial biofilm and acid production, each of the free substances or nanoliposomes in 4 concentrations (0, 1.5, 3, 6 mg/ml) in the Active Attachment biofilm model with saliva and culture medium was incubated. The results showed that lactoferrin nanocoating increased the ability to inhibit biofilm and acid production by this bacterium due to the slow release of lactoferrin from liposomes. When increasing the concentration of free and nanoliposomal lactoferrin to a concentration of 3 mg/ml, a significant decrease in the number of bacteria in the biofilm was observed compared to the control sample ($P < 0.01$). However, increasing the concentration of free lactoferrin again increased the number of bacteria in the biofilm. Meanwhile, nanoliposomal lactoferrin at a concentration of 6 mg/ml still caused a decrease in bacteria in the biofilm, which was insignificant compared to the concentration of 3 mg/ml ($P > 0.01$). From the obtained results, it can be concluded that nanoliposomal lactoferrin can be used to design products related to oral and dental health.

ARTICLE INFO

Article History:

Received :2022/12/12

Accepted :2023/03/13

Keywords:

Lactoferrin,
Nanoliposome,
Polymicrobial biofilm,
Tooth decay

DOI: 10.22034/FSCT.20.136.26

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.136.3.1

*Corresponding Author E-Mail:

Tabatabai@um.ac.ir